



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

O RÁCIO NEUTRÓFILOS/LINFÓCITOS NO LINFOMA B DIFUSO DE CÉLULAS
GRANDES NO CÃO

MARIANA PEREIRA DE JESUS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil

Dr. Joaquim José Garcia Pereira Henriques

ORIENTADOR: Dr. Joaquim José Garcia
Pereira Henriques

CO-ORIENTADORA: Doutora Maria da
Conceição da Cunha e Vasconcelos
Peleteiro

Lisboa

2017



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

O RÁCIO NEUTRÓFILOS/LINFÓCITOS NO LINFOMA B DIFUSO DE CÉLULAS
GRANDES NO CÃO

MARIANA PEREIRA DE JESUS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutora Solange Judite Roque Alves
Coelho

Dr. Joaquim José Garcia Pereira Henriques

ORIENTADOR: Dr. Joaquim José Garcia
Pereira Henriques

CO-ORIENTADORA: Doutora Maria da
Conceição da Cunha e Vasconcelos
Peleteiro

Lisboa

2017

Dedicatória

Lokah samastah sukhino bhavantu:

Que todos os seres possam ser livres e felizes.

Que os meus pensamentos, palavras e atos contribuam de alguma forma para essa felicidade.

Agradecimentos

Antes de mais é necessário agradecer a toda a minha família, pelo apoio, motivação e confiança. Obrigada por acreditarem em mim, mesmo quando eu não o fiz. Ao meu pai por ser o exemplo vivo de que nunca é tarde para ser criança. Ao meu irmão, o meu primeiro “cobaia” em tantas brincadeiras. À minha madrinha, que me ensinou a amar os animais e me fez querer ser Veterinária, ainda eu não sabia ler nem escrever. Um agradecimento especial à minha mãe, por há 6 anos me ter “arrastado” para Évora. Sem ela não teria sido capaz de ultrapassar o medo de saltar para fora do ninho.

Quero, então, agradecer ao Dr. Joaquim Henriques, por todo o conhecimento transmitido e pela paciência e calma com que sempre o fez. Obrigada por ter sido o meu mentor, por ter confiado em mim, e me ter dado a oportunidade de realizar o meu estágio curricular no Hospital Veterinário de Berna. Foram 6 meses de aprendizagem e trabalho nos quais não podia ter sido melhor ensinada, orientada ou apoiada.

Agradeço também a toda a equipa do Hospital Veterinário Berna: Dra. Ana Ribeiro, Dra. Inês Fonseca, Dra. Inês Sousa, Dra. Joana Sousa, Dra. Patrícia Duarte, Dra. Tânia Sena, Dr. Ricardo Felisberto e Dr. Tiago Gaspar; às enfermeiras Alexandra Pinto, Fátima Ferro, Joana Farinha, Liliana Sousa, Marta Fernandes e Margarida Sousa e ainda ao tarefeiro João Alves.

Foi graças a vocês que todos os dias me levantei e deitei com o sorriso no rosto, mesmo quando estes eram mais difíceis. São, sem dúvida, a melhor equipa com que alguém poderia desejar trabalhar. Um especial reconhecimento à melhor companheira de estágio que se poderia ter, a Ana Sá. Ninguém teria compreendido melhor as minhas (nossas) dúvidas e inseguranças, mas também as alegrias e confiança das conquistas.

À professora Maria Conceição Peleteiro, por ter aceitado ser minha co-orientadora e por todo o apoio e conselhos prestados. Agradeço-lhe a disponibilidade, esclarecimentos, acompanhamento e ainda toda a sua contribuição nesta dissertação.

Agradeço de seguida a todos os meus colegas da Universidade de Évora. Foi lá que, cimentei o amor pela Medicina Veterinária e confirmei a certeza de que este era o meu caminho. Agradeço em particular à Carolina Paz, a melhor companheira de casa, de estudo e amiga.

Agradeço também a todos os que constituem a FMV-ULisboa, instituição que se revelou uma segunda casa e onde recebi todas as ferramentas para construir o meu futuro.

Às muito minhas melhores amigas Ana Rita Bexiga e Joana Furtado. Certamente, seria uma pessoa diferente e muito menos feliz se não tivesse crescido com elas. Obrigada por todas as

aventuras. Que continuemos por muitos anos a descobrir o que se esconde por trás de cada porta.

Às novas amizades que desenvolvi ao longo destes últimos 6 anos: Carolina Afonso e Cunha Canotilho, Catarina Stilwell, Daniela Jacinto, Mariana Fragoso e Marina Dionísio. Sem elas não teria tido em quem me apoiar para ultrapassar todas as pedras deste caminho.

Por fim, mas nunca menos importante, ao meu companheiro de vida, David Amorim. Porque não me lembro de mim sem ti, nem me imagino sem te ter a meu lado. Obrigada por me desafiares a ser sempre o melhor de mim e não cederes às minhas fraquezas. Obrigada por me teres incentivado a continuar quando eu quis desistir. Que seja sempre assim.

Resumo

O tipo de linfoma mais comum é o Linfoma B Difuso de Células Grandes (LBDCG), correspondendo a cerca de 50% dos linfomas no cão. O Rácio Neutrófilos/Linfócitos (RNL) determinado antes da quimioterapia em LBDCG humano é considerado um bom indicador de prognóstico quanto ao Tempo de Sobrevivência (TS - tempo decorrido desde o diagnóstico até à morte). No LBDCG canino tal não está confirmado, faltando estudos que comprovem a eficácia deste rácio como indicador prognóstico em cães tratados com CHOP. Este estudo tem por objectivo relacionar o RNL com o TS e o Período de Progressão (PP - tempo decorrido desde a data de diagnóstico até à recidiva) em cães com LBDCG. Estudaram-se dados relativos de 30 cães assistidos de 2010 a 2016, num hospital veterinário. Os dados foram analisados no programa RStudio. A amostra é constituída por 30 cães, 14 machos (46,67%) e 16 fêmeas (53,33%). Sete eram de raça indeterminada (23,33%), 4 Rottweiler (13,33%), 4 Labrador Retriever (13,33%), 2 Cocker Spaniel (6,67%), e 13 cães de raças diversas. A média de idades é de 9,7 anos (intervalo de 4 a 17). Os valores de RNL encontram-se entre 0,488 e 23,544. Os valores de TS encontram-se entre 32 a 705 dias. Os valores de PP encontram-se entre 0 e 431 dias. A correlação entre RNL e PP é de -0.215 (valor de $p=0,254$). A correlação entre RNL e TS é de -0,3823 (valor de $p=0,03708$). Com o aumento do RNL, existe tendência para que o TS seja menor e pior o prognóstico. De acordo com a análise inicial dos dados, obteve-se um valor “cut-off” de $RNL=3,1$, superior ao qual o TS diminui significativamente e por isso se considera ter pior prognóstico. Este valor é susceptível de sofrer alterações com o aumento da amostra em estudo e do tratamento de mais dados. Pensa-se que o RNL refletirá a actividade inflamatória e a reduzida resposta imune celular antitumoral dos linfócitos, comparando a resposta inflamatória tumoral com a imunidade do hospedeiro. Os resultados encontrados vão ao encontro do descrito em medicina humana, ou seja, existe correlação negativa entre RNL e TS. Aumentando o RNL, piora o prognóstico, particularmente em valores superiores ao “cut-off” de $RNL=3,1$. Os estudos efectuados até à data em medicina veterinária não demonstraram relevância estatística, possivelmente por não incidirem sobre um histotipo específico de linfoma. Este é o primeiro estudo que avalia a associação prognóstica entre RNL e TS em cães com LBDCG tratados com CHOP. Pela análise desta amostra, a confirmar com estudos mais aprofundados, conclui-se que há motivos para considerar que o RNL poderá ter valor prognóstico em cães com LBDCG tratados com CHOP.

Palavras-chave: Linfoma B Difuso de Células Grandes no Cão; Rácio Neutrófilos/Linfócitos; Tempo de Sobrevivência, Período de Progressão, CHOP.

Abstract

The most common histotype of lymphoma is the Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL), representing about 50% of dog's lymphoma. The Neutrophil/Lymphocyte ratio (NLR) determined prior to chemotherapy in human DLBCL is considered a good prognosis indicator for the Survival Time (ST-time that goes from the diagnosis to death). In dog's DLBCL this has not yet been confirmed and studies are missing that validate this ratio as an indicator of prognosis. The main goal of this study is to demonstrate the interaction between the NLR, the TS and the Time to Progression (TTP- time frame from the diagnosis to relapse) of dogs with DLBCL. We studied data from 30 dogs seen from 2010 to 2016 in a veterinary hospital. The data was analyzed in the RStudio Program. The sample consisted of 30 dogs, 14 males (46,67%) and 16 females (53,33%). Seven were of indeterminate breed, 4 Rottweillers (13,33%, 4 Labrador Retriever (13,33%), 2 Cocker Spaniel (6,67%) and 13 dogs of other breeds. The average age was 9,7 years (interval 4 to 17).

The NLR values obtained were between 0,488 and 23,544. The TS values ranged from 32 and 705 days. The TPP values ranged from 0 and 431 days. The correlation between the RNL and TPP was -0,215 (p-value=0,254). The correlation between NLR and TS was 0,3823 (p-value=0,03708). With the increase of NLR, there was a tendency for the ST to decrease, worsening the prognosis. A cut-off value of NLR=3,1 was obtained, above which the ST decreased significantly and the prognosis was considered to be worst. These values will probably suffer adjustments as the present study proceeds with a larger number of studied cases. It is thought that the NLR mirrors the pro-neoplastic activity of the neutrophils and the reduced anti-neoplastic immune response of the lymphocytes, relating the inflammatory neoplastic response with the host immunity. The results found are similar to what has been described in human medicine, as there is a negative correlation between the NLR and the ST. As the NLR increases, the prognosis worsens, especially for values above the cut-off of 3,1. The existing studies in veterinary medicine were not statistically relevant, possibly because they did not focus on a specific lymphoma histotype. This is the first study that evaluates the prognosis relation between the NLR and the ST in dogs with DLBCL treated with CHOP. The analysis of the present data, to be confirmed by more in depth studies, suggest that there are good reasons to consider that the NLR prior to chemotherapy might have a prognostic value in dogs with DLBCL treated with CHOP.

Keywords: Diffuse Large B Cell Lymphoma; Neutrophil/Lymphocyte Ratio; Survival Time; Time to Progression; CHOP.

Índice

Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Resumo.....	vi
Abstract	vii
Índice.....	viii
Índice de Tabelas	x
Índice de Figuras	xi
Índice de Gráficos	xii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	xiii
Descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio	xv
1. Introdução.....	1
2. Linfoma no Cão.....	2
2.1. Generalidades.....	2
2.2. Epidemiologia	2
2.3. Etiologia	3
2.3.1. Fatores Ambientais	3
2.3.2. Fatores Infecciosos.....	4
2.3.3. Fatores Genéticos e Moleculares	5
2.3.4. Fatores Imunológicos	5
3. Classificação do Linfoma.....	7
3.1. Nota histórica: Evolução dos Sistemas de Classificação de Linfoma	7
4. Sistema de classificação da OMS.....	10
5. Classificação Anatômica	12
5.1. Forma Multicêntrica.....	12
5.2. Forma Gastrointestinal	13
5.3. Forma Mediastínica.....	14
5.4. Forma Cutânea	15
5.5. Formas Atípicas de Linfoma.....	16
5.5.1. Forma Hepato-esplénica	16
5.5.2. Forma Intravascular (angiotrópico, angioendoteliomatose)	16
6. Classificação.....	18
6.1. Avaliações Citológica e Histológica	18
6.2. Imunofenotipagem	20
7. Linfoma de Células B.....	23
7.1. Linfoma B Difuso de Células Grandes	23
7.1.1. Características Morfológicas do LBDCG	23
7.1.2. Patogénese Molecular do LBDCG.....	24
7.1.3. A Patogénese do LBDCG	25
8. Diagnóstico.....	27
8.1. História e Sinais Clínicos	27
8.2. Diagnóstico Laboratorial.....	29
8.3. Urianálise	30
8.4. Imagiologia	30
8.5. Avaliação da medula óssea	31
8.6. Estadiamento	32
9. Tratamento	33
9.1. Quimioterapia.....	33
9.1.1. Protocolo CHOP	34
9.2. Reindução e Quimioterapia de Resgate	35

9.3.	Imunoterapia.....	36
9.3.1.	Anticorpos Monoclonais	37
9.3.2.	Vacinas Anti Tumoriais	37
9.4.	Efeitos Adversos Secundários	38
10.	Prognóstico	40
10.1.	Rácio Neutrófilos/Linfócitos (RNL)	42
11.	A Resposta Inflamatória	45
11.1.	Linfócitos.....	46
11.1.1.	Linfócitos T	46
11.1.2.	Linfócitos B	47
11.2.	Neutrófilos.....	47
12.	Resposta imunitária anti-tumoral.....	48
12.1.	Resposta imunitária inata e adaptativa.....	48
12.2.	A Hipótese da Imunoedição Tumoral.....	48
13.	Avaliação do Rácio Neutrófilos/Linfócitos no Linfoma B Difuso de Células Grandes	
	50	
13.1.	Objetivos.....	50
13.2.	Materiais e Métodos	50
13.3.	Resultados.....	51
13.3.1.	Caracterização da amostra estudada	51
13.3.2.	Determinação do Valor Cut-off de RNL	54
13.4.	Discussão	55
14.	Conclusão	60
15.	Bibliografia.....	62
16.	Anexos.....	71

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação de Linfoma segundo Gall & Mallory	8
Tabela 2 – Classificação Histológica dos Tumores Hematopoiéticos nos Animais Domésticos segundo a OMS (Adaptado de Valli et al., 2002)	11
Tabela 3 – Sistema de estadiamento clínico do linfoma das espécies domésticas de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (Vail et. al, 2013).....	32
Tabela 4 – Protocolo CHOP curto, de 19 semanas, da universidade de Wisconsin-Madison (Adaptado de Turek et al., 2008)	35
Tabela 5 – Efeitos adversos secundários à quimioterapia, com base no VCOG-CTCAE (Adaptado de Tomiyasu et al., 2010).....	39
Tabela 6 – Relação entre RNL e a percentagem de animais com o TS	54

Índice de Figuras

Figura 1- Esquema de evolução dos sistemas de classificação do linfoma.....	7
Figura 2 – Doente com Linfoma Nasal de imunofenótipo T.....	12
Figura 3 – Linfadenopatia pré-escapular num cão com linfoma multicêntrico (seta).....	13
Figura 4 – Representação de lesão cutânea solitária, ulcerada, eritematosa, pruriginosa, de doente com Linfoma T Periférico Não Especificado com apresentação multicêntrica e com progressão cutânea epiteliotrópica.....	16
Figura 5 – Pormenor da câmara anterior do globo ocular com a presença de Hifema, consequente de uveíte secundária a Linfoma	17

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição da amostra quanto ao género	51
Gráfico 2 - Distribuição da amostra quanto à raça.....	52
Gráfico 3 – Comparação do sub-estadio em função do estadio da OMS	53
Gráfico 4 – Distribuição total da amostra de acordo com os vários estadios e subestadios da OMS	53
Gráfico 5 - Correlação RNL-TS e RNL-PP	54

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AAT:	Antigénios Associados ao Tumor
ADH:	Hormona Anti-diurética
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
AgNOR:	Região Organizadora Nucleolar Argirofílica
ALB:	Albumina
ALT:	Alanina Aminotransferase
Bcl-2:	Proteína anti-apoptótica “Linfoma de Células B 2”
CAL:	Contagem Absoluta de Linfócitos
CAM:	Contagem Absoluta de Monócitos
CD:	Do inglês “Cluster of Differentiation”
CHOP:	Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina e Prednisolona
CICLO:	Ciclofosfamida
c-Myc:	Gene Mielocitomatose Celular
CREA:	Creatinina sérica
DLBCL:	Do inglês “Diffuse Large B-cell Lymphoma”
DOX:	Doxorrubicina
EBV:	Do inglês “Epstein-Barr Virus”
ELP:	Enterite Linfoplasmocitária
FAS:	Fosfatase Alcalina Sérica
GEP:	Do inglês “Gene Expression Profile”
GGT:	Gama-Glutamiltransferase
GLU:	Glucose
HIF-1:	Do inglês “Hypoxia-inducible factor 1”
HSPPC:	Do inglês “Heat Shock Proteins Peptide Chaperone”
Ig:	Imunoglobulina
IGH:	Cadeias Pesadas da Imunoglobulina
IL 10:	Interleucina 10
IL:	Interleucina
ILSG:	Do inglês “International Lymphoma Study Group”
IV:	Intravenoso
Ki-67:	Proteína Codificada pelo gene MKI67
LBDCG:	Linfoma B Difuso de Células Grandes
LBDCG-CB:	Variante Centroblástica de LBDCG
LBDCG-IB:	Variante Imunoblástica de LBDCG
LCB:	Linfoma de Células B
LCT:	Linfoma de Células T
LDH:	Lactato Desidrogenase
LIT:	Linfócitos Infiltrantes do Tumor
LnH:	Linfoma non-Hodgkin
LSS:	Do inglês “Lymphoma Specific Survival”
MALT:	Do inglês “Mucosa-Associated Lymphoid Tissue”

MAT:	Macrófagos Associados ao Tumor
NCI:	Do inglês “National Cancer Institute”
NCI-WF:	Do inglês “National Cancer Institute Working Formulation”
NF-kB:	Do inglês “Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer”
NK:	Do inglês “Natural killer”
OMS:	Organização Mundial de Saúde
PAAF:	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PCNA:	Do inglês “Proliferating Cell Nuclear Antigen”
PCR:	Reação em Cadeia da Polimerase
PP:	Periodo de Progressão
PT:	Proteínas Totais
RC:	Remissão Completa
RCT:	Recetor de Células T
REAL:	Do inglês “Revised European-American Lymphoma”
RLM:	Rácio Linfócitos/Monócitos
RMF:	Resistência a Múltiplos Fármacos
RNI:	Do inglês “Reactive Nitrogen Intermediates”
RNL:	Rácio Neutrófilos/Linfócitos
ROS:	Do inglês “Reactive Oxygen Species”
SmIgG:	Do inglês “Surface membrane IgG”
SmIgM:	Do inglês “Surface membrane IgM”
SNC:	Sistema Nervoso Central
SNP:	Sistema Nervoso Periférico
STAT3:	Do ingles “Signal Transducer and Activator of Transcription 3”
TAC:	Tomografia Axial Computorizada
TCR:	Recetores de Células T
TCRBCL:	Linfoma B de células grandes rico em células T
Tregs:	Células T reguladoras
TS:	Tempo de Sobrevivência
VCOG-CTCAE:	Terminologia de critérios de efeitos adversos do grupo co-operativo de oncologia veterinária
VCR:	Vincristina
WM:	Wisconsin Madison

Descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio

O estágio curricular foi realizado no Hospital Veterinário Berna (HVB), em Lisboa, entre 10 de Setembro de 2015 e 1 de Março de 2016. A carga horária total terá sido aproximadamente de 1040 horas.

No decorrer do estágio, foram acompanhados todos os serviços do hospital: Medicina Interna, Internamento, Patologia Clínica, Anestesiologia, Cirurgia, Imagiologia e Cardiologia. A carga horária foi repartida em turnos rotativos de 8 horas por todos os departamentos, à excepção do Internamento cujos turnos foram de 10 horas. Na área de Medicina Interna, assistiu-se a consultas de clínica geral, participando na elaboração da anamnese, a exames de estado geral, a listas de diagnósticos diferenciais e a planos de diagnóstico e terapêutica. Foi, ainda, possível executar e auxiliar na elaboração de procedimentos tais como: colheitas de sangue, realização de análises clínicas e interpretação das mesmas (hemograma completo, bioquímicas, ionograma, microhematócrito), determinação de densidade urinária e proteínas totais séricas utilizando um refratómetro, realização de exames completos de urina, venopunção para colocação de cateter e sistema de venoclise, medição da glicémia, drenagem de líquido de derrames cavitários, realização de punções aspirativas por agulha fina, limpeza de feridas, administração de medicamentos (via oral, subcutânea, intramuscular e endovenosa), imunização, medição da pressão arterial, teste de fluoresceína, teste de Schirmer, preparação e administração de quimioterápicos, observação de lâminas de citologia e de esfregaços sanguíneos ao microscópio óptico, remoção de pontos simples, realização de pensos simples e pensos gordos, realização de electrocardiograma, entre outros. Para além das consultas de clínica geral, foi, também, possível assistir a consultas de especialidade nas áreas de Oncologia, Oftalmologia, Dermatologia, Neurologia, Ortopedia e Cardiologia. Sendo o HVB um centro de referência em Oncologia, houve uma maior percentagem de consultas de especialidade nesta área. Assim sendo, participou-se em inúmeras consultas desta área e sessões de quimioterapia, o que incluía a recepção dos animais, colocação de cateteres, colheita de sangue para análises sanguíneas, administração de fármacos e esclarecimento de dúvidas dos proprietários sobre cuidados especiais a ter com os seus animais.

No bloco cirúrgico, fez-se, também, o acompanhamento dos animais doentes antes, durante e após os procedimentos, realizando a avaliação pré-cirúrgica e a preparação do doente (colocação de cateter, intubação endotraqueal, tricotomia, desinfeção e limpeza da zona de incisão), administração da pré-medicação e a indução anestésica, preparação do material cirúrgico e aparelhos de monitorização anestésica (frequência cardíaca, pressão arterial,

pulsoximetria, electrocardiograma), monitorização da anestesia, auxílio durante a cirurgia e, ainda avaliação e cuidados pós-cirúrgicos no recobro. Durante as cirurgias, também se teve a oportunidade de desempenhar as funções de anestesista, ajudante de cirurgião, cirurgião (orquiectomias eletivas em gatos) e circulante. As cirurgias assistidas durante o estágio foram de vária ordem, nomeadamente: ovariohisterectomias eletivas e não eletivas, orquiectomias eletivas (cães e gatos) ou relacionadas com doença prostática (cães), remoção de cálculos por cistotomia, colocação de *bypass* renal, resolução de hérnia perineal, remoção de corpo estranho por enterotomia, resolução de fístula oronasal, destartarizações e extrações dentárias e cirurgias oncológicas (remoção de diferentes tipos de tumores, mastectomias, esplenectomias, hemimandibulectomia, ressecção da cabeça do fémur, realização de biópsias de osso e de outras lesões – orais, nódulos cutâneos – e ainda biópsia de linfonodos para diagnóstico de linfoma, etc.). Foi, também, possível assistir e auxiliar a outras terapias realizadas no tratamento de doentes oncológicos, como terapia fotodinâmica, laser, eletroquimioterapia, imunoterapia e crioterapia. Foram, ainda, visualizadas algumas cirurgias por mínima invasão como endoscopias, broncoscopias, toracoscopias, rinoscopias e laparoscopias.

A área de Imagiologia incidiu sobre os serviços de radiologia e ecografia (abdominal e cardíaca), onde houve oportunidade de se participar no posicionamento e contenção dos animais e na realização e interpretação dos exames.

Na área de Internamento foram prestados cuidados de higiene, alimentação e administração de medicação aos doentes internados, consoante as necessidades individuais e atendendo à evolução clínica de cada um em particular, sendo realizados procedimentos idênticos aos efetuados em consulta. Durante o turno de Internamento, era efetuada a monitorização dos sinais vitais, tais como frequência cardíaca e respiratória, cor das mucosas, tempo de repleção capilar, temperatura corporal e pulso. Outra tarefa desempenhada foi, também, a responsabilidade pelo passeio dos doentes no exterior, bem como a limpeza das boxes.

No Hospital Veterinário Berna realiza-se uma vez por semana um *Journal Club*, no qual os médicos veterinários e estagiários de medicina veterinária fazem apresentações sobre um determinado tema, com posterior discussão e partilha de ideias e experiências acerca de casos clínicos recentes e anteriores, relacionados com o tema em questão. Neste âmbito, teve-se a cargo a responsabilidade de dinamização por um dos dias de *Journal Club*, tendo-se, também, realizado uma apresentação acerca de Linfoma Mediastínico Felino.

Durante este período, foi possível consolidar e por em prática conhecimentos teóricos adquiridos ao longo dos últimos cinco anos de formação e houve a possibilidade de se

experienciarem situações reais, bem como, ainda, a aquisição extensa de novos conhecimentos com ênfase, na área de oncologia veterinária. Verificou-se, também, a prática de vários procedimentos essenciais e que fazem parte do quotidiano de uma clínica de pequenos animais de companhia. Quanto à escolha do tema da dissertação, “Rácio Neutrófilos/Linfócitos como factor de prognóstico em Linfoma B Difuso de Células Grandes”, foram tidos em conta diversos fatores, nomeadamente, o interesse pessoal pela área da oncologia veterinária, pelo fato deste ser o linfoma mais comum tanto em cães como em humanos, e, sobretudo, por este fator prognóstico ainda não se encontrar estudado em LBDCG canino. Para além disso, a existência da especialidade de oncologia no HVB, concretiza-se numa elevada casuística de LBDCG, contribuindo para a recolha de um número de casos que se revelou suficiente para a elaboração deste estudo e, consequentemente, desta dissertação.

Para além dos resultados obtidos, e que levaram à execução do trabalho desta dissertação de mestrado, foi ainda elaborado e apresentado um *poster* relativo ao tempo de sobrevivência em gatos com linfoma mediastínico no Congresso do Hospital Veterinário Montenegro 2016 (Anexo 1), também uma comunicação oral, sobre o valor prognóstico do RNL em DLBCL no cão tratado com CHOP (como primeira autora) e, ainda, um *poster* sobre tumores cardíacos, (como co-autora) no Congresso do Hospital Veterinário Montenegro 2017:

Jesus, M.; Sousa, I.; Felisberto, R.; Henriques, J. (2016) – Estudo Retrospectivo: Avaliação do Tempo de Sobrevivência em Gatos com Linfoma Mediastínico. XII Congresso Hospital Veterinário Montenegro - Oncologia Sem Segredos. Organizado pelo Hospital Veterinário Montenegro, no Europarque. Decorreu em Sta. Maria da Feira, nos dias 20 e 21 de fevereiro de 2016. Comunicação em painel.

Jesus, M.; Peleteiro, M.C.; Henriques, J. (2017) – Valor Prognóstico do Rácio Neutrófilos/Linfócitos Antes da Quimioterapia em Cães com Linfoma B Difuso de Células Grandes Tratados Com Protocolo CHOP – Patologias Cardio-Respiratórias Sem Segredos. Organizado pelo Hospital Veterinário Montenegro, no Europarque. Que decorreu em Sta. Maria da Feira, nos dias 18 e 19 de fevereiro de 2017. Comunicação Oral.

Fonseca, M.I. ... (2017) Comparação Entre a Apresentação Clínica de Cães Com Tumores Cardíacos e o Diagnóstico Histopatológico Definitivo - Patologias Cardio-Respiratórias Sem Segredos. Organizado pelo Hospital Veterinário Montenegro, no Europarque. Que decorreu em Sta. Maria da Feira, nos dias 18 e 19 de fevereiro de 2017. Comunicação em painel.

1. Introdução

A prevalência das neoplasias nos animais de companhia tem vindo a aumentar ao longo do tempo. Este aumento deve-se a vários fatores e está em grande parte ligado ao facto dos nossos animais de companhia terem vidas cada vez mais longas, resultado de uma melhor nutrição, de mais e melhores cuidados médicos e do desenvolvimento da relação e interação humano-animal. Assim, sendo o cancro uma doença mais comum em animais idosos, com o aumento da esperança média de vida dos animais, cresceu também a probabilidade de estes virem a desenvolver uma neoplasia (Withrow, 2013).

As neoplasias hematopoiéticas são, portanto, frequentemente diagnosticadas em animais de companhia. O linfoma representa o tumor hematopoiético mais frequente no cão e no gato (Teske *et al.*, 1994; Valli *et al.*, 2011). Na espécie canina, este corresponde entre 8 e 9% de todos tumores malignos. Trata-se de uma doença multifactorial e sem etiologia confirmada no cão (Morris & Dobson, 2001).

O linfoma é caracterizado pela proliferação maligna de linfócitos provenientes de qualquer órgão, sendo por isso uma neoplasia com diferentes apresentações clínicas, o que pode, por vezes, tornar difícil o seu diagnóstico (Argyle *et al.*, 2008). Existem estudos que comprovam a similaridade morfológica clínica e fenotípica entre o linfoma no cão e o linfoma no Homem (Valli *et al.*, 2000).

Sendo uma doença de incidência crescente tanto em animais de companhia como em humanos, a mesma representa um desafio clínico, na medida em que a sua evolução, resposta à terapêutica e definição de prognóstico continuam a ser de difíceis, uma vez que estão dependentes de vários fatores (Teske *et al.*, 1994; Valli *et al.*, 2011). O tipo mais comum de linfoma no cão é o Linfoma B Difuso de Células Grandes (LBDCG), que representa cerca de 50% dos linfomas nesta espécie, sendo este também o mais prevalente no Homem (Aricò *et al.*, 2014).

Em pessoas com Linfoma B Difuso de Células Grandes (LBDCG), o Rácio Neutrófilos Linfócitos (RNL) prévio à quimioterapia é considerado um bom indicador de prognóstico. No entanto, ainda não foi comprovada associação entre este rácio e o tempo de sobrevida (TS) no LBDCG canino, faltando estudos para comprovar a sua eficácia prognóstica nesta espécie (Mutz *et al.*, 2013). Este trabalho tem, então, como objectivo estudar a importância prognóstica do RNL em cães com LBDCG tratados com protocolo CHOP.

2. Linfoma no Cão

2.1. Generalidades

Linfoma, linfossarcoma ou linfoma maligno são os vários termos aplicados para designar um diverso grupo de neoplasias. Estas têm origem na proliferação autónoma e descontrolada de células linforeticulares, das quais os locais de oncogenese são, por norma, os tecidos linfóides primários e secundários, tais como os linfonodos e o baço. No entanto, e devido à ampla difusão de linfócitos no organismo, o linfoma pode manifestar-se praticamente em qualquer localização extranodal, como a pele, os olhos e o sistema nervoso central (SNC). É um dos tumores mais comuns e mais frequentemente tratado com quimioterapia, afetando cães de todas as raças e idades (Vail *et al.*, 2013; Valli *et al.*, 2011).

2.2. Epidemiologia

O linfoma representa 8 a 9% das neoplasias no cão, sendo, assim, uma das mais frequentes nesta espécie. Afeta principalmente animais entre os 6 e os 9 anos de idade, podendo, no entanto, desenvolver-se em qualquer fase da vida (Argyle *et al.*, 2008; Vail *et al.*, 2013). Esta tendência para o aparecimento de doenças oncológicas em animais mais idosos, pode estar relacionada com o aumento de lesões no ADN celular, conduzindo a mutações e consequente, ao desenvolvimento neoplásico (Waters *et al.*, 2006).

No que diz respeito ao género, Villamil *et al.*, 2009, conduziu um estudo no qual refere que existe um risco inferior em fêmeas inteiras, concluindo que existe uma relação entre o género e o aparecimento de linfoma, sugerindo, assim, que as hormonas sexuais em fêmeas inteiras têm um papel protetor face ao aparecimento da doença. No entanto, a maioria dos estudos mostra que o género não é um fator de risco relevante (Argyle *et al.*, 2008; Couto *et al.*, 2009). Algumas raças demonstram, também, uma maior predisposição para o desenvolvimento de linfoma, sendo exemplos disso o Boxer, Bull Mastiff, Basset Hound, São Bernardo, Scottish Terrier, Airdale Terrier e Bulldog. De modo inverso, os Teckel e Lulu da Pomerania são raças que estão indicadas como tendo um menor risco de vir a desenvolver esta neoplasia (Vail *et al.*, 2013). Certos estudos referem, ainda, que determinadas raças estão associadas ao desenvolvimento de um fenótipo particular de linfoma, como por exemplo o Boxer para o desenvolvimento de linfoma T (Vail *et al.*, 2013).

No cão, a entidade de linfoma mais comum é o Linfoma B Difuso de Células Grandes (LBDCG) - Diffuse Large B Cell Lymphoma em inglês (DLBCL) (Ponce *et al.*, 2010; Valli *et*

al., 2011; Aresu *et al.*, 2013), representando cerca de 50% de todos os linfomas desta espécie (Ferrareso *et al.*, 2014).

2.3. Etiologia

A etiologia do linfoma ainda é em grande parte desconhecida. Sabe-se, contudo, que esta é multifatorial, podendo incluir fatores ambientais como fumo de tabaco, agentes virais, dieta e fatores imunossupressores e fatores individuais como fatores genéticos e moleculares, imunossupressão, inflamação crónica e influência do género (Polton *et al.*, 2010).

2.3.1. Fatores Ambientais

O papel dos fatores ambientais no desenvolvimento de neoplasias do sistema hematopoiético tem vindo a ser objeto de estudo ao longo dos anos. Existe evidência de que a exposição a herbicidas compostos por ácido fenoxiacético, em particular o 2,4-diclorofenoxiacético, favoreça o desenvolvimento de linfoma em humanos (Vail *et al.*, 2013). Um estudo efetuado por Kaneene *et al.* em 1999, indicou que cães cujos donos aplicassem estes herbicidas tinham também uma maior probabilidade de desenvolver linfoma, quando comparados com canídeos não expostos. No entanto, vários estudos subsequentes não comprovaram esta teoria (Garabrant *et al.*, 2002; Vail *et al.*, 2013). Neste âmbito, outros trabalhos epidemiológicos anteriormente desenvolvidos referem que, de facto, o uso de certos produtos químicos na manutenção do relvado, potenciam o aumento de risco de linfoma. Deste modo, são necessários estudos mais rigorosos e exaustivos que demonstrem quais os compostos químicos que estão efetivamente relacionados com o aparecimento desta neoplasia (Uebelhoer *et al.*, 2012). Relativamente à associação com a exposição a fortes campos magnéticos, foi encontrada uma fraca associação entre este fator e o desenvolvimento de linfoma no cão, não se considerando, por isso, que este constitua um risco relevante (Sommer *et al.*, 2007). Ainda neste tópico, dois estudos europeus sugerem, ainda, a poluição ambiental como um factor de risco relevante (Turek *et al.*, 2008; Marconato *et al.*, 2009). Está também demonstrado que animais que habitam em zonas industriais com exposição a químicos domésticos, apresentam desenvolvimento de linfoma numa idade mais precoce, quando comparados com animais que não estavam expostos aos mesmos agentes (Gavazza *et al.*, 2001). Um outro estudo existente concluiu que locais com incineradoras de lixo, locais poluídos e com lixo radioactivo também devem ser considerados indicadores de risco para o desenvolvimento de linfoma em cães (Pastor *et al.*, 2009).

2.3.2. Fatores Infeciosos

Têm sido conduzidos estudos com o objectivo de verificar a relação entre a infecção viral crónica e a oncogénese. Na espécie canina está documentada a associação entre infecções por gamaherpesvirus Epstein-Barr (EBV) e o aparecimento de linfoma (Huang *et al.*, 2012; Cohen *et al.*, 2013), tendo sido detectados anticorpos contra antígenos das capsides virais de EBV em 41% dos cães e a presença de partículas virais nos linfonodos dos cães afectados (Huang *et al.*, 2012). Segundo um outro trabalho, cães com diversas neoplasias (incluindo linfoma) eram, então, mais frequentemente positivos que o grupo de controlo, mas não se notou nenhuma associação com linfomas de células B (como LBDCG) em específico (Waugh *et al.*, 2015).

Existe, também, uma associação direta entre a infecção por *Helicobacter spp.* e o desenvolvimento de linfoma gástrico, comprovada já no Homem e no gato (Bridgeford *et al.*, 2008). Esta associação não está ainda definitivamente confirmada em cães, mas existe evidência de que a infecção por *Helicobacter* em beagles de laboratório resulta em formações foliculares linfóides gástricas. Em humanos, estas são consideradas uma forma precursora de linfoma do tecido linfóide associado à mucosa (MALT – Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) (Rossi *et al.*, 1999; Vail *et al.*, 2013).

Como acontece com a Schistomatose humana, há relato de um caso de infecção pelo tremátode *Heterobilharzia americana* e o aparecimento de linfoma numa cadela de 11 anos de idade (Stone *et al.*, 2011).

A associação entre linfoma e parasitas hemáticos está ainda pouco documentada. Ainda assim, está descrito um caso de linfoma extranodal de células T num cão de 8 anos de idade com leishmaniose. A estimulação antigénica prolongada e imunossupressão crónica provocadas pela leishmaniose parecem ter um papel importante no desenvolvimento do linfoma (Foglia Manzillo *et al.*, 2008). Há também registo de uma cadela de 5 anos de idade que desenvolveu linfoma de células B no decorrer de tratamento para ehrlichiose e histoplasmose. Aqui, mais uma vez, o aparecimento desta neoplasia é associado à inflamação crónica provocada por ambos os parasitas (Brunker *et al.*, 2007).

Por fim, é ainda de referir um estudo realizado em Golden Retriever que demonstrou através de análise de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que existia a mesma percentagem de *Bartonella* em linfonodos de cães saudáveis e de cães com linfoma, não se encontrando assim relação entre a presença desta bactéria e o desenvolvimento de linfoma (Duncan *et al.*, 2008).

2.3.3. Fatores Genéticos e Moleculares

Avanços recentes na área da citogenética molecular, como técnicas de microarranjo de genes, têm sido aplicados para estudar alterações nos cromossomas de cães com linfoma (Vail *et al.*, 2013). Segundo Thomas *et al.*, 2003, as aberrações mais frequentes, num grupo de 25 casos analisados, incluíam o ganho dos cromossomas 13 e 31 e a perda do cromossoma 14. As aberrações cromossómicas têm sido, também, associadas com o prognóstico: um estudo de 61 casos de linfoma, demonstrou que cães com trissomia do cromossoma 13 (25% dos casos) tinham vantagem prognóstica, apresentando um aumento da duração da primeira remissão e do tempo de sobrevida total (Devitt *et al.*, 2009; Vail *et al.*, 2013).

É ainda de referir que existem diferenças na prevalência de subtipos imunofenotípicos de linfoma entre diferentes raças, apontando para a existência de um risco hereditário. É o caso dos Boxer, Sharpei e Airedale Terrier que exibem sobretudo linfoma de células T e o caso dos Cocker Spaniel e Basset Hound que apresentam sobretudo linfomas de células B (Modiano *et al.*, 2005).

Com o alargamento do conhecimento de eventos moleculares e oncogénese, sabe-se hoje que certos fenómenos epigenéticos, genes supressores de tumores/oncogenes, vias de transdução de sinal e vias de morte celular programada são comuns em linfomas do Homem e, possivelmente, também em cães e gatos (Vail *et al.*, 2013). No linfoma canino têm sido reportadas aberrações no N-ras, p53 (supressor tumoral), Rb e 16 ciclina-dependente quinase, bem como alterações na actividade da telomerase (Nasi *et al.*, 2001; Carioto *et al.*, 2001; Yazawa *et al.*, 2003). Demonstrou-se, ainda, que a depleção do cromossoma 11 ou a deleção do gene p16 em linfócitos T estão associadas à fosforilação da proteína do retinoblastoma e potencialmente envolvidas na génese do linfoma. Os genes c-Myc, IGH, RCT- β e BCL-2 surgem na espécie canina com a mesma organização estrutural que os genes equivalentes humanos, e nestes a activação dos genes c-Myc e BCL-2 por translocações cromossomais é um dos principais precursores no desenvolvimento do linfoma non Hodgkin (LnH) (Teske *et al.*, 1994; Shetty *et al.*, 1995).

2.3.4. Fatores Imunológicos

O Sistema Imunitário também tem sido implicado como sendo um factor de risco relevante para o desenvolvimento de linfoma. Em medicina humana, alguns estudos relatam o desenvolvimento de linfoma secundariamente a doenças auto-imunes ou doenças inflamatórias crónicas (Jagadeesh *et al.*, 2012). As alterações do sistema imunitário em cães, como, por exemplo, a trombocitopenia imunomediada, têm sido associadas a um maior risco

de desenvolvimento desta neoplasia quando comparadas a uma população normal, independentemente da idade ou do género (Foster *et al.*, 2000). Suspeita-se também, que em doentes sob o efeito de fármacos imunossupressores como a ciclosporina, a debilidade do sistema imunitário possa ser um fator predisponente para o desenvolvimento de tumores hematopoiéticos. De facto, está descrito um caso de aparecimento de linfoma num cão após realização de tratamento com ciclosporina (Blackwood *et al.*, 2004). Do mesmo modo, um artigo sugere que exista uma associação entre a imunodesregulação, observada em cães com dermatite atópica, e o risco de desenvolvimento de linfoma de células T epiteliotrópico. Não se sabe, no entanto, se a relação está com a doença em si, ou com o tratamento imunomodulador normalmente aplicado (Vail *et al.*, 2013).

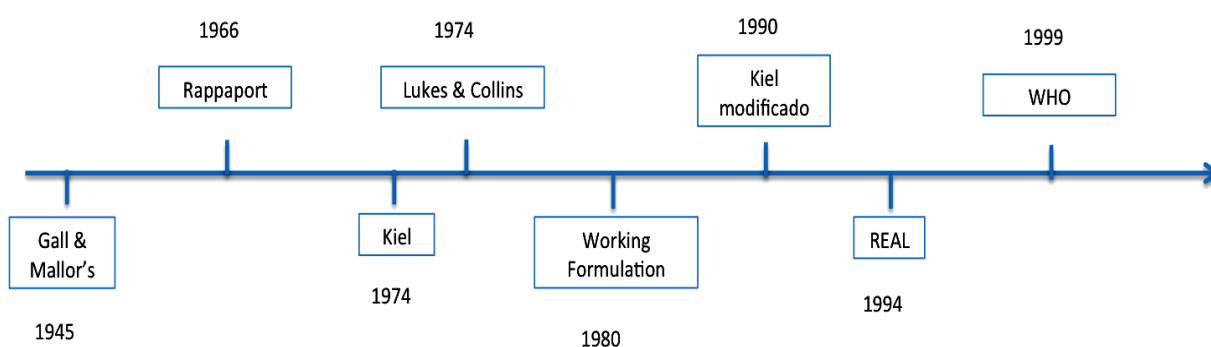
3. Classificação do Linfoma

A classificação aplicada nas mais variadas doenças constitui a linguagem da medicina. Assim, é importante que as doenças sejam descritas, definidas e denominadas, antes que possam ser estudadas, diagnosticadas e tratadas. É por isso essencial criar um consenso nas definições e terminologia das doenças para a prática clínica e investigação. Um sistema de classificação deve conter doenças distintamente definidas em termos clínicos e patológicos, abrangendo todas as entidades conhecidas, para que possa, deste modo, servir como base para estudos futuros e que permita também, a incorporação de novas informações e descobertas (Swerdlow *et al.*, 2008). A classificação tem ainda, a grande vantagem de incluir a totalidade das entidades no contexto de uma única doença (Valli *et al.*, 2013).

O linfoma constitui um grupo heterogêneo de neoplasias com características morfológicas e manifestações clínicas distintas (Vail *et al.*, 2013). Assim sendo, ao longo dos anos têm sido feitos esforços para estabelecer uma classificação adequada e racional deste tipo de neoplasias, tanto em medicina veterinária como em medicina humana (Figura 1). Visto existirem inúmeras semelhanças entre os animais e o homem nesta área, as classificações para o linfoma do cão têm sido adaptadas com base nos esquemas de classificação do linfoma humano (Valli, *et al.*, 2002; Valli, *et al.*, 2011).

3.1. Nota histórica: Evolução dos Sistemas de Classificação de Linfoma

Figura 1- Esquema de evolução dos sistemas de classificação do linfoma



Com o decorrer dos anos, as classificações desenvolvidas para o linfoma não-Hodgkin no Homem vieram a ser adaptadas pelos patologistas veterinários para tentar classificar o linfoma nas espécies veterinárias afetadas (Valli *et al.*, 2000; Cesari *et al.*, 2009; Vezzali *et al.*, 2009; Valli *et al.*, 2011; Durham *et al.*, 2012).

Ao longo dos últimos tempos, verificou-se uma constante atualização dos sistemas de classificação de linfoma, tanto em medicina humana como em medicina veterinária. Esta evolução deu-se, sobretudo, devido à capacidade de identificação das células pelo imunofenótipo, pelos diferentes comportamentos clínicos de linfomas com a mesma morfologia celular e pelo aparecimento de novos conhecimentos sobre o mecanismo celular (Valli *et al.*, 2013).

A primeira tentativa de classificação do linfoma no homem foi feita em 1942 por Gall & Mallory, tendo sido aplicada ao cão em 1945 por Bloom *et al.* Esta consistia num sistema simplificado que se baseava na morfologia celular (Valli *et al.*, 2002).

Tabela 1 - Classificação de Linfoma segundo Gall & Mallory

Classificação segundo Gall & Mallory	
	Linfoma de células estaminais
	Linfoma (monocítico) clasmocítico
	Linfoma linfoblástico
	Linfoma linfocítico
	Linfoma de Hodgkin
	Sarcoma de Hodgkin
	Linfoma folicular

Este sistema foi alterado em 1966 por Henry Rappaport, que englobava a identificação do padrão histológico de crescimento neoplásico (difuso ou nodular) e a diferenciação citológica do tumor. Introduzia-se, assim, a noção de que a arquitetura tumoral interferia com o prognóstico clínico do tumor, sendo substituído o termo linfoma folicular por quatro tipos de linfoma nodular, todos apresentando melhor prognóstico (Rappaport *et al.*, 1966; Valli *et al.*, 2011; Swerdlow *et al.*, 2013). No entanto, como a maioria dos animais foi classificada como tendo tumores difusos de morfologia celular histiocítica, a classificação de Rappaport demonstrou baixo valor prognóstico em medicina veterinária (Valli *et al.*, 2002; Vail *et al.*, 2013).

O primeiro sistema de classificação com base em princípios imunológicos (fenótipo B e T) foi desenvolvido em 1974 por Karl Lennert, em Kiel, na Alemanha e posteriormente revisto em 1988 e 1992. Lennert designou os diferentes linfócitos neoplásicos, comparando-os com células benignas em diferentes estadios de diferenciação e aplicando a classificação de “centrócitos” a linfócitos de pequenas dimensões e “centroblastos” a linfócitos de grandes

dimensões. Este sistema de classificação foi, então, muito utilizado em medicina veterinária na Europa (Fry *et al.*, 2003, Valli *et al.*, 2011). No mesmo período, o sistema de classificação de Lukes-Collins (Lukes & Collins, 1974) prevalecia na América do Norte (Teske *et al.*, 1994; Fournel-Fleury *et al.*, 2002). Este descrevia o conceito de “célula centrofolicular”, propondo que o centro folicular era o local de transformação das células do tipo B. Esta classificação era essencialmente funcional, sem divisão consoante o grau de malignidade. Contudo, a aplicabilidade destes sistemas de classificação revelou-se reduzida na espécie canina (Valli, *et al.*, 2002; Vail *et al.*, 2013; Vezzali *et al.*, 2009).

Com o objectivo de unir as classificações Norte Americana (Lukes-Collins) e Europeia (Kiel), o “National Cancer Institute” (NCI) conduziu um estudo que resultou na “National Cancer Institute Working Formulation” (NCI-WF), largamente utilizada na América do Norte e no resto do mundo, embora na Europa predominasse a classificação de Kiel (Valli *et al.*, 2011). A NCI-WF categorizava as neoplasias exclusivamente através de critérios morfológicos e classifica-as quanto ao grau de malignidade em: baixo, intermédio e alto. A malignidade relacionava-se com a biologia tumoral e a probabilidade de sobrevivência do doente. (Valli *et al.*, 2000; Vezzali *et al.*, 2009).

Contudo, devido à inflexibilidade do sistema de classificação NCI-WF, tornava-se impossível a inclusão de novas entidades de linfoma, gerando novas dificuldades de comunicação entre patologistas e oncologistas. Para colmatar esta constante dificuldade, o Grupo de Estudo Internacional do Linfoma (ILSG, do inglês *International Lymphoma Study Group*) criou em 1994 o sistema de classificação “Revisão Europeia-Americana” (REAL, do inglês *Revised European-American Lymphoma classification*) que incluía características como a apresentação clínica, a morfologia celular, o imunofenótipo e o genótipo (Valli *et al.*, 2002; Vezzali, *et al.*, 2009; Vail *et al.*, 2013).

Este sistema foi amplamente utilizado e mais tarde, em 2002, apenas foram realizadas pequenas actualizações pela Organização Mundial de Saúde (OMS), tendo sido comprovada a sua eficácia na classificação de linfoma em medicina humana e tendo sido atualizada em 2008 (Swerdlow *et al.*, 2008). Posteriormente, este mesmo sistema de classificação foi adaptado e validado para medicina veterinária (Valli *et al.*, 2011).

4. Sistema de classificação da OMS

O sistema de classificação da OMS define várias entidades de linfoma e leucemias como doenças individuais, tendo em conta a topografia, imunofenótipo, tipo celular, análise molecular e citogenética, sendo os três primeiros utilizados no diagnóstico e classificação de linfoma em espécies veterinárias. Além disso, este sistema prevê a adição de novas informações quanto às entidades descritas e permitindo, por exemplo, a criação de novos subtipos de entidade de linfoma, considerando uma maior especificidade diagnóstica e variação de prognóstico dentro da mesma entidade.

Recentemente, foi demonstrada a eficácia do esquema de classificação da OMS para o linfoma no cão, sendo atingida uma concordância diagnóstica entre patologistas na ordem dos 83%, demonstrando uma elevada consistência e aplicabilidade diagnóstica e, ainda, evidenciando a importância da imunofenotipagem na classificação exata do linfoma (Valli *et al.*, 2011). A entidade Linfoma B Difuso de Células Grandes está relatada como a mais frequentemente diagnosticada na espécie canina (Dobson J., 2004; Vail, 2012; Vezzali *et al.*, 2010).

Tabela 2 – Classificação Histológica dos Tumores Hematopoiéticos nos Animais Domésticos segundo a OMS (Adaptado de Valli et al., 2002)

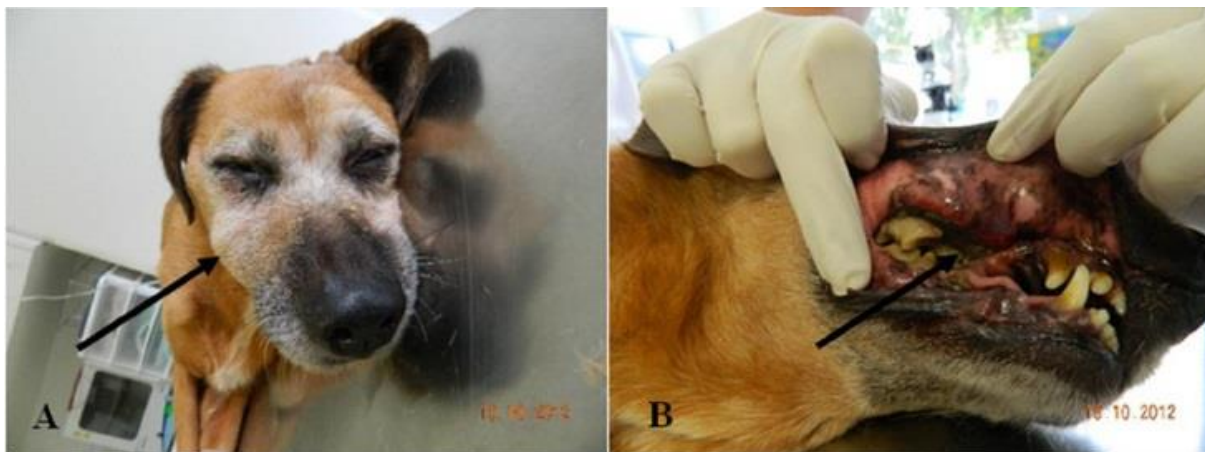
Tumores do Sistema Linfoide	
Neoplasias linfóides de células B	Neoplasias de Células T
Neoplasia de células B precursoras	Neoplasia de células T e NK precursoras
Leucemia/ linfoma linfoblástico de células B	Leucemia/linfoma de células T
Neoplasia de células B maduras	Neoplasia de células T/NK maduras
Leucemia/linfoma linfocítico crónico de células B	Distúrbios de células grandes e granulares: <ul style="list-style-type: none"> – Leucemia linfocítica crónica de células T ou NK – Leucemia linfoproliferativa de células T grandes granulares
Linfoma linfocítico de tipo intermédio de células B	Neoplasias cutâneas de células T: Linfoma cutâneo epiteliotrópico/não epiteliotrópico
Linfoma linfoplasmocitário	Linfoma de células T extranodal/periférico: <ul style="list-style-type: none"> – Tipo linfoide ou inflamatório misto
Linfomas foliculares: <ul style="list-style-type: none"> – Linfoma das células do manto – Linfoma folicular de células centrais do tipo I, II ou III – Linfoma nodal ou esplénico da zona marginal 	Linfoma/leucemia de células adultas tipo células T
Linfoma extranodal da zona marginal do MALT	Linfoma angioimunoblástico
Leucemia de <i>hairy cells</i>	Linfoma angiotrópico
<ul style="list-style-type: none"> – Plasmocitoma indolente ou anaplásico – Mieloma de células Plasmáticas 	Linfoma intestinal de células T
<ul style="list-style-type: none"> – Linfoma de células B grandes rico em células T – Linfoma imunoblástico de células grandes – Linfoma difuso de células B grandes: IB; CB – Linfoma tímico de células B grandes 	Linfoma anaplásico de células grandes
Linfoma de células B de alto grau de tipo Burkitt	

5. Classificação Anatômica

O linfoma pode ser classificado com base na sua localização anatômica, critério histológico e características imunofenotípicas (Figura 2). No caso do cão, cerca de 80% dos animais afetados apresenta localização multicêntrica da doença e apenas 20 a 40% dos animais afetados apresenta sinais clínicos (perda de peso, letargia, anorexia e pirexia) ao diagnóstico (Vail *et al.*, 2013).

As localizações anatômicas mais comuns (por ordem decrescente de prevalência) são: multicêntrica, gastrointestinal, mediastínica e cutânea. As formas primárias extranodais podem ocorrer em qualquer localização fora do sistema linfático, incluindo os olhos, o sistema nervoso central, a bexiga, o coração e a cavidade nasal. (Vail *et al.*, 2011).

Figura 2 – Doente com Linfoma Nasal de imunofenótipo T¹



A. Deformação facial (seta);

B. Imagem intraoral da lesão revela presença de ulceração, infecção e fístula oro-nasal. O resultado da biópsia revelou a presença de linfoma T epiteliotrópico

5.1. Forma Multicêntrica

A forma multicêntrica é a mais frequente no cão, representando cerca de 80% dos animais afetados. A manifestação clínica mais comum nestes casos é a linfadenopatia generalizada (com aumento de 5 a 15 vezes o tamanho normal), móvel e indolor, podendo estar inicialmente localizada nos linfonodos sub-mandibulares e pré-escapulares, espalhando-se então para os restantes linfonodos (Figura 3) (Couto *et al.*, 2009). A manifestação secundária mais comum desta apresentação de linfoma é a infiltração hepática e/ou esplênica, podendo

¹ Fotografias gentilmente cedidas pelo Dr. Joaquim Henriques

também ocorrer envolvimento da medula óssea em casos mais avançados. Em 27% a 34% dos canídeos afectados existe também envolvimento pulmonar, com infiltração difusa visível no exame radiológico (Vail *et al.*, 2013).

Apenas 20 a 40% destes doentes apresentam sintomatologia ao diagnóstico (Jacobs *et al.*, 2002; Vail *et al.*, 2013). Assim, a maioria dos doentes com linfoma multicêntrico apresenta-se em sub-estadio “a” de acordo com o esquema de estadiamento da OMS, ou seja, não apresenta sinais de doença sistémica grave. Contudo, podem apresentar uma série de sintomas inespecíficos, associados a um sub-estadio “b” do estadiamento da OMS, como anorexia, perda de peso, vômito, diarreia, emaciação, ascite, dispneia, polidípsia, poliúria e febre (Ettinger *et al.*, 2003; Marconato *et al.*, 2011). A poliúria e polidípsia são particularmente evidentes em cães com hipercalcémia maligna (Bergman *et al.*, 2012). Os doentes com linfoma multicêntrico podem ainda apresentar sinais clínicos relacionados com discrasias sanguíneas secundárias à infiltração da medula óssea pelo tumor, anemia paraneoplásica, trombocitopenia ou neutropenia (Vail *et al.*, 2013).

Figura 3 – Linfadenopatia pré-escapular num cão com linfoma multicêntrico (seta)²



5.2. Forma Gastrointestinal

Esta localização anatómica é muito menos comum, representando 5% a 7% de todas as formas de linfoma, e está descrita como sendo mais comum em machos do que em fêmeas (Couto *et al.*, 2009; Vail *et al.*, 2013). Muitos dos canídeos afetados exibem sintomatologia

² Fotografia gentilmente cedida por Dr. Joaquim Henriques

inespecífica como perda de peso, anorexia, sinais de má absorção, vômito, diarreia e pan-hipoproteinemia, sendo esta última um indicador negativo de prognóstico (Couto, 2009). Ocasionalmente dá-se ruptura da massa intestinal, com peritonite ou oclusão intestinal secundária.

O linfoma gastrointestinal primário afeta frequentemente múltiplos segmentos, embora possa ocorrer de forma focal. Existe um espessamento da parede com estreitamento do lúmen, frequente ulceração da mucosa e submucosa e ocasionalmente, infiltração transmural. O fígado, baço e os linfonodos regionais também se encontram muitas vezes envolvidos (Vail *et al.*, 2013).

Segundo um estudo realizado por Coyle & Steinberg, 2004, em que foram avaliados 44 casos de linfoma gastrointestinal (GI) canino, a localização mais frequente foi o intestino delgado, seguindo-se o estômago e, secundariamente, o fígado. Este estudo retrospectivo revelou ainda que a forma de linfoma gastrointestinal primário canino mais frequente era a de células T (75% dos casos), exibindo muitas vezes epiteliotropismo. Cães de raça Boxer e Sharpei estão referidos como sendo mais predispostos a desenvolver linfoma GI (Vail *et al.*, 2013).

O principal diagnóstico diferencial para este tipo de neoplasia é a enterite linfo-plasmocítica (ELP). Histopatologicamente, a distinção entre linfoma gastrointestinal e ELP pode ser difícil e alguns autores sugerem que a ELP pode ser uma alteração pré-linfomatosa do trato gastrointestinal. Contudo, ao contrário do que ocorre no linfoma gastrointestinal, em casos de ELP não há envolvimento da camada muscular. Uma síndrome de doença imunoproliferativa intestinal caracterizada por ELP com subsequente desenvolvimento em linfoma está descrita em Basenjis (Vail *et al.*, 2013). Patologicamente, algumas destas neoplasias podem ser semelhantes a tumores de células plasmáticas e pode haver produção aberrante de imunoglobulinas (Vail *et al.*, 2013). Os tempos médios de sobrevivência para o linfoma alimentar são aproximadamente 4 meses, com realização de quimioterapia (Turek *et al.*, 2008).

5.3. Forma Mediastínica

Esta apresentação representa aproximadamente 5% dos casos de linfoma no cão (Vail & Thamm, 2005). É caracterizada por um aumento dos linfonodos do mediastino cranial e/ou tímicos. O linfoma mediastínico é, então, caracterizado por um alargamento do mediastino cranial e/ou das estruturas tímicas, estando os sinais clínicos relacionados com a extensão da doença, resultando num comprometimento respiratório e/ou polidipsia/poliúria devido a hipercalcemia (Vail *et al.*, 2013). Normalmente, os cães apresentam-se à consulta em stress

respiratório, provocado pelo efeito de massa e efusão pleural, com intolerância ao exercício e regurgitação. Adicionalmente, podem apresentar síndrome pré-cava, devido à compressão da veia cava cranial exercida pelo tumor, caracterizado por edema da cabeça, pescoço e membros anteriores (Vail *et al.*, 2013). A hipercalcemia é a alteração mais comum nesta localização anatômica de linfoma, afetando cerca de 10% a 40% dos cães, estando a forma mediastínica normalmente associada a um fenótipo de células T. Segundo um estudo realizado por Rosenberg *et al.*, 1991, 43% dos canídeos com linfoma mediastínico apresenta hipercalcemia. O tempo médio de sobrevivência associado a este tipo de tumor, com tratamento, ronda os 5 a 8 meses (Turek *et al.*, 2008).

5.4. Forma Cutânea

Embora o linfoma seja a neoplasia hematopoiética mais frequente no cão, a forma cutânea é pouco comum, constituindo apenas 3 a 8% de todos os linfomas nesta espécie (Bouchard *et al.*, 2000). Existem várias designações para este tumor, sendo conhecida por alguns autores como “o grande imitador”. Contudo, estas designações não são mais do que o reflexo das várias manifestações clínicas que a entidade exhibe: *Mycosis fungoides*, Síndrome de Sézary, Reticulose pagetóide e doença de Woringer-Kolopp (Bouchard *et al.*, 2000; Fontaine *et al.*, 2009).

O linfoma cutâneo é uma neoplasia espontânea da pele e das mucosas, que surge, sobretudo, em animais idosos (média de 11 anos de idade), não estando descrita nenhuma predisposição racial (Bouchard *et al.*, 2000; Vail *et al.*, 2013). As lesões podem ser unifocais ou múltiplas (sendo estas de pior prognóstico), ligeiras, equizematosas, em placa ou sob a forma de tumores nodulares de grandes dimensões, podendo surgir ainda úlceras e dermatite eritematosa ou esfoliativa, com hipopigmentação focal e alopecia, que podem ou não ser pruríticas (Vail & Thamm, 2005; Vail *et al.*, 2013).

Esta apresentação de linfoma é, normalmente, classificada como epiteliotrópica, ou não epiteliotrópica. O linfoma epiteliotrópico - *Mycosis fungoides*, que recebeu este nome devido à aparência de cogumelo, que este tumor exhibe em humanos - tem origem em células T, à semelhança do que ocorre também nos humanos. No entanto, nos cães estas normalmente representam células CD8+, enquanto nos humanos estas são normalmente CD4+. Pode ser definido como uma neoplasia espontânea da pele e membranas mucosas, que ocorre em cães idosos (Bouchard *et al.*, 2000). O linfoma cutâneo não epiteliotrópico forma nódulos ou placas dérmicas ou subcutâneas múltiplas ou singulares. Histologicamente, não envolve a

epiderme nem a derme papilar e afecta a camada média e profunda da derme e “subcutis”. (Vail *et al.*, 2013).

O linfoma cutâneo pode ainda ser caracterizado segundo o imunofenótipo em origem nas células B ou T, sendo este último raro e associado a um pior prognóstico, com tempos médios de sobrevivência de alguns meses a 2 anos de vida (Figura 4) (Fontaine *et al.*, 2009).

Figura 4 – Representação de lesão cutânea solitária, ulcerada, eritematosa, pruriginosa, de doente com Linfoma T Periférico Não Especificado com apresentação multicêntrica e com progressão cutânea epiteliotrópica³



5.5. Formas Atípicas de Linfoma

5.5.1. Forma Hepato-esplénica

A forma hepatoesplénica é relativamente incomum, caracterizando-se por uma ausência de linfadenopatia periférica marcada, com infiltração de linfócitos malignos no fígado ou baço, normalmente com origem em células T (Fry *et al.*, 2003; Cienava *et al.*, 2004). Biologicamente, esta forma de linfoma é muito agressiva, e apresenta fraca resposta à terapia e, normalmente, os cães afectados apresentam sinais clínicos inespecíficos tais como letargia, inapetência, fraqueza e icterícia (Fry *et al.*, 2003; Cienava *et al.*, 2004). Em humanos, este tumor é composto por células T, que expressam receptores γ e δ , tendo este imunofenótipo sido confirmado em pelo menos um cão (Cienava *et al.*, 2004).

5.5.2. Forma Intravascular (angiotrópico, angioendoteliomatose)

A apresentação intravascular é uma forma distinta de linfoma, que se define pela existência de proliferações de linfócitos neoplásicos dentro do lúmen e parede dos vasos sanguíneos, na

³ Fotografia gentilmente cedidas por Dr. Joaquim Henriques

ausência de uma massa primária ou de leucemia. Este tem sido reportado várias vezes em medicina veterinária e na maioria dos casos envolve o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Nervoso Periférico (SNP), incluindo o olho. Assim, cães com linfoma intravascular normalmente apresentam sinais clínicos relacionados com o SNC, SNP, ou oculares. Cães com linfoma primário no SNC podem apresentar um envolvimento multifocal ou solitário (Dallman *et al.*, 1968). São sinais clínicos desta apresentação convulsões, paralisia e parésia. O linfoma ocular caracteriza-se pela infiltração e espessamento da íris, hipopion, hifema, sinequia posterior e glaucoma, sendo a uveíte anterior mais comum em casos avançados (estadio V) (Figura 5) (Swanson *et al.*, 1990).

O imunofenótipo B é o mais comum em humanos, contudo, na maioria dos casos analisados em cães este tem, sobretudo, origem em células T ou em “null-cells” (nem T, nem B), embora esteja, também, reportado um caso de fenótipo de células B (Ridge *et al.*, 2004).

Figura 5 – Pormenor da câmara anterior do globo ocular com a presença de Hifema, consequente de uveíte secundária a Linfoma⁴



⁴ Fotografia gentilmente cedida pelo Dr. Joaquim Henriques

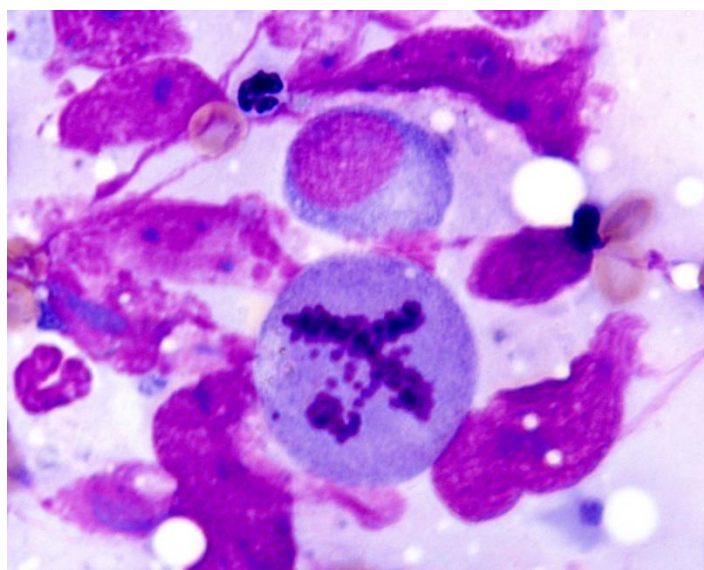
6. Classificação

6.1. Avaliações Citológica e Histológica

O estudo do tecido e das células que constituem o tumor é essencial para o diagnóstico definitivo de linfoma (Meda *et al.*, 2000; Kudnig *et al.*, 2012). Em medicina veterinária, o diagnóstico morfológico de linfoma canino tem sido historicamente baseado em detalhes citológicos (Aresu *et al.*, 2014).

Na colheita de amostras para avaliação de linfonodos, devem ser evitados os que se encontram associados a áreas normalmente reativas, como os linfonodo submandibulares (excepto se estes forem os únicos que se encontram aumentados) (Kudnig *et al.*, 2012). Assim, são os linfonodos pré-escapulares ou poplíteos os mais indicados para este fim. Idealmente deve ser efectuada a excisão total do linfonodo, incluindo a cápsula, colocá-lo em formol e então submetê-lo a análise histopatológica. Contudo, e como ocorre na maioria dos casos, o diagnóstico de linfoma pode ser efectuado através do estudo citológico dos tecidos afectados obtidos por Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) destes mesmos linfonodos (Vail *et al.*, 2013). Esta análise baseia-se na morfologia das células neoplásicas, nas suas características de malignidade, no tamanho nuclear e sua proporção relativamente ao citoplasma, na forma do núcleo, no padrão e distribuição de cromatina, no número e tamanho dos nucléolos, na heterogeneidade ou monotonia celular e ainda, na presença de figuras de mitoses normais ou atípicas (Figura 6). Embora esta classificação citológica possa permitir a identificação dos tipos celulares mais frequentemente associados ao linfoma, não permite uma percepção da arquitetura dos tecidos da neoplasia como a análise histopatológica (Galindo *et al.*, 2000; Kudnig *et al.*, 2012).

Figura 6 - Imagem citológica de linfonodo de cão com linfoma maligno, apresentando mitose atípica. Coloração de Giemsa, ampliação de 1000x⁵



Habitualmente, são observados em predominância blastos de dimensão média a grande (2,0 vezes o tamanho eritrocitário), podendo estes apresentar um nucléolo visível e citoplasma intensamente basófilo, ou cromatina finamente dispersa sem nucléolo identificável. Na avaliação inicial do tecido linfóide suspeito, achados citológicos como monotonia celular com predomínio de células imaturas, podem ser indicativos de linfoma. Uma hiperplasia marcada, caracterizada pelo aumento do número de células linfóides de grande dimensão, pode ser difícil de distinguir de linfoma, e linfomas de células pequenas podem apresentar poucos indícios citológicos de malignidade (Valli *et al.*, 2013).

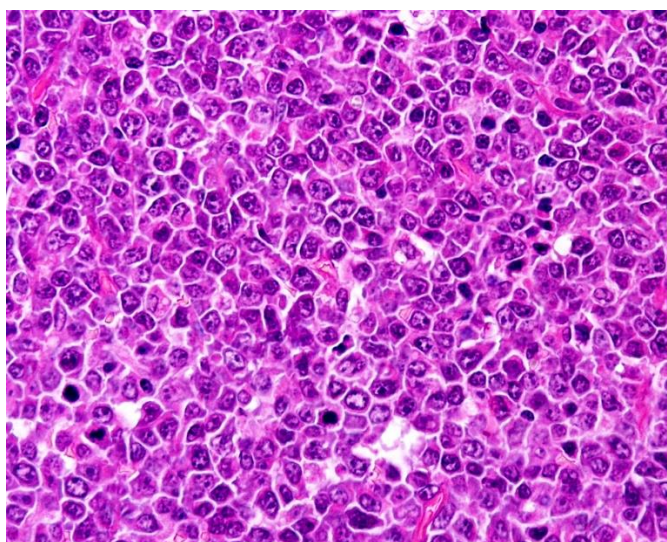
O estudo histopatológico é essencial para o diagnóstico absoluto e para a correta classificação de acordo com o esquema da OMS, uma vez que permite avaliar o padrão da lesão (difuso ou nodular) e a arquitetura dos tecidos afetados (Figura 7). Como já foi referido, deverá ser submetido para análise o linfonodo completo ou parcialmente, incluindo a cápsula, e a amostra armazenada e fixada em formol (Vail *et al.*, 2013). No caso de estar presente uma hiperplasia linfóide, pode ocorrer colonização da cápsula do linfonodo, contudo, os seios periféricos permanecem intactos. Em contraste, em caso de neoplasia, os seios periféricos estão normalmente destruídos, particularmente no linfoma de alto grau (Jacobs *et al.*, 2002).

A identificação da linhagem celular B ou T é determinada com recurso a técnicas de imunohistoquímica ou imunocitoquímica, a partir de amostras de análise histopatológica ou citológica respectivamente. Histologicamente, os linfomas com origem em células B

⁵ Fotografia gentilmente cedida por Prof. Dr. Jorque Manuel de Jesus Correia

apresentam, geralmente, uma intensa basofilia citoplasmática e um maior número de núcleos em posição excêntrica. Podem apresentar uma diferenciação plasmocitóide respectiva, excluindo as formas linfoblásticas que se apresentam menos pleomórficas que em linfomas de células T. São, ainda, reconhecidas a neoangiogénese e a marcada inflamação como características relacionadas com linfomas de fenótipo T (Caniatti *et al.*, 1996; Gibson *et al.*, 2004).

Figura 7 – Imagem de corte histológico de linfonodo de um cão com LBDCG, tipo centroblástico, onde se observam figuras de mitose, coloração Hematoxilina & Eosina ampliação de 400x⁶



6.2. Imunofenotipagem

A imunofenotipagem é utilizada para determinar o fenótipo das células que constituem o tumor, verificando-se essencial para a correta classificação de acordo com o esquema de classificação da OMS. Dado que no tecido linfóide é expectável a identificação de uma população celular heterogénea (de fenótipo B e T), a documentação de uma população homogénea do mesmo fenótipo é sugestivo de um processo neoplásico (Figuras 8 e 9). O imunofenótipo de um linfócito é determinado pela expressão de moléculas específicas de células B, como CD79a, CD20 e células T, como CD3 (Jubala *et al.*, 2005; Willmann *et al.*, 2009; Valli, Kass, San Myint, & Scott, 2013; Valli, 2013).

Dobson *et al.*, 2001, demonstrou que o imunofenótipo não estava relacionado com a resposta tumoral à quimioterapia. No entanto, havia uma forte influência no tempo de sobrevivência do paciente, sendo o fenótipo de células T associado a um tempo livre de doença

⁶ Fotografia gentilmente cedida por Prof. Dr. Jorque Manuel de Jesus Correia

consideravelmente inferior. Os resultados publicados mostraram, também, que a maioria dos linfomas correspondia a um imunofenótipo de células B.

Num estudo realizado por Thilakaratne *et al.*, 2010, o fenótipo foi identificado, tendo como base rearranjos clonais detectados por PCR (reacção em cadeias de polimerase), em que se concluiu que a presença de clonalidade do gene da Imunoglobulina (Ig) indicava um fenótipo de células B, ao passo que a detecção de genes receptores de células T (TCR em inglês) rearranjados clonalmente indicavam um fenótipo de células T. A análise por PCR constitui, então, uma alternativa na determinação do fenótipo em linfoma, tendo sido aplicada para complementar o diagnóstico, estadiamento e definir o prognóstico em casos de linfoma (Williams *et al.*, 2008; Thilakaratne *et al.*, 2010).

Existem, hoje em dia, laboratórios que efectuam a técnica de imunofenotipagem através de citometria de fluxo. Uma das vantagens desta técnica é o facto de ser mais rápida comparativamente à histologia ou citologia, podendo demonstrar uma maior aplicabilidade na clínica quotidiana. Esta afirmação é válida, sobretudo, para a espécie canina em que a natureza de células neoplásicas num linfonodo tende a ser semelhante, ao contrário do que ocorre na espécie felina e equina (Williams *et al.*, 2008). Por outro lado, permite analisar uma grande quantidade de células em simultâneo, com critérios estatísticos bastante precisos (Gibson *et al.*, 2004). Independentemente da técnica utilizada, pode-se afirmar que o conhecimento do imunofenótipo tem desempenhado um papel importante na caracterização e estabelecimento de prognóstico em cães com linfoma.

Figura 8 – Linfoma T - CD3 positivo, com marcação membranar e citoplasmática⁷

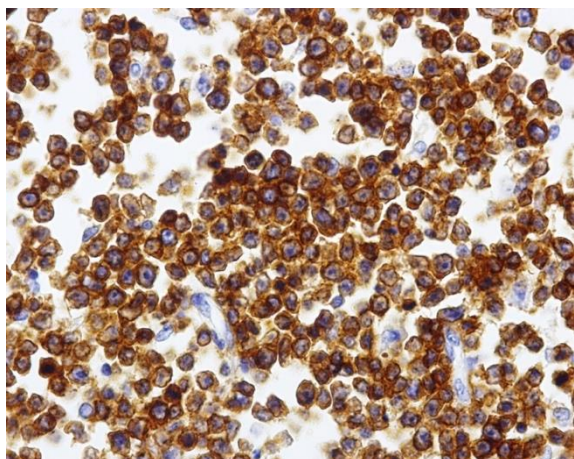
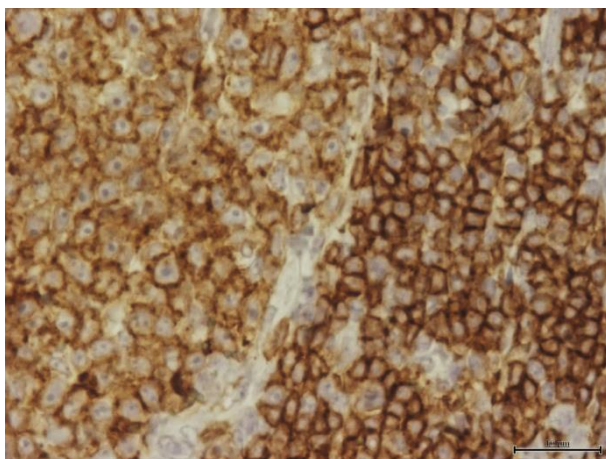


Figura 9 – Linfoma B – CD20 positivo, com marcação membranar⁸



⁷ Fotografia gentilmente cedida por Prof^a Dr^a M^a Conceição Peleteiro

⁸ Fotografia gentilmente cedida por Prof^a Dr^a M^a Conceição Peleteiro

7. Linfoma de Células B

Linfoma é um termo genérico que, normalmente, abrange uma doença heterogénea, incluindo um número de subtipos de variável malignidade, que ocorre como resultado da transformação de linfócitos T ou B (Aresu, 2016). A maioria dos linfomas em cães têm origem em células B. O seu mecanismo de patogénese ainda não é completamente compreendido, mas acredita-se que as células B malignas, responsáveis pela formação do linfoma, surjam de diferentes estádios de desenvolvimento e da diferenciação de células B normais. Os linfomas de células B têm translocações dos genes que codificam imunoglobulinas e proteínas anti-apoptóticas, deixando as células B menos sensíveis a apoptose (Rusak *et al.*, 2016). Sendo o objectivo deste trabalho o de determinar o valor prognóstico do RNL em cães com LBDCG, o subtipo mais comum de LCB, é importante caracterizar este com maior detalhe.

7.1. Linfoma B Difuso de Células Grandes

Dentro dos linfomas de células B encontra-se o Linfoma B Difuso de Células Grandes (Diffuse Large B-cell Lymphoma - DLBCL), que é o tumor linfoproliferativo mais comum no cão, representando aproximadamente cerca de 50% dos linfomas nesta espécie (Aricó *et al.*, 2014). Este exhibe um comportamento clínico variável, tendo em conta as diferentes respostas a tratamentos semelhantes, mesmo em casos de estadio clínico semelhante (Aresu *et al.*, 2016).

7.1.1. Características Morfológicas do LBDCG

As características morfológicas do LBDCG são a disposição difusa de camadas de células B neoplásicas e de núcleo uniformemente aumentado (> 2 eritrócitos de diâmetro) e o escasso citoplasma das células neoplásicas. Os núcleos são normalmente redondos e raramente divididos ou indentados (Valli *et al.*, 2011). O número de mitoses varia, mas são detectáveis em todos os campos a uma ampliação de 40x. Consistentemente com a classificação de Kiel, a entidade LBDCG pode, ainda, ser dividida de acordo com o número e localização dos seus nucléolos. Células B grandes com múltiplos nucléolos, maioritariamente localizados na periferia nuclear, são referidas como centroblasticos (LBDCG – CB). Os LBDCG com um único nucleolo central proeminente são designados imunoblasticos (LBDCG – IB). Contudo, muitos casos têm ambos os tipos de disposição nucleolar e apenas são considerados LBDCG – IB os que apresentam pelo menos 90% deste tipo de disposição nucleolar, ou seja, um único nucléolo central proeminente (Valli *et al.*, 2011). Outras alterações estruturais em LBDCG incluem a diminuição da espessura da cápsula do linfonodo e a compressão dos seios

medulares. Os centros germinativos podem estar presentes na periferia do córtex e existe destruição das estruturas nodais normais e compressão dos seios medulares. Os macrófagos (que podem apresentar corpos tingíveis) podem estar presentes de forma difusa e o seu número varia de acordo com a taxa mitótica (Valli *et al.*, 2011).

7.1.2. Patogénese Molecular do LBDCG

Em 2013, Frantz *et al.* foram os primeiros a estudar o linfoma do cão por análise de “gene expression profile” (GEP). Utilizando microarranjos de ADN, foram investigados 35 linfomas, representando os subtipos histológicos mais comuns, incluindo o LBDCG (Zamani *et al.*, 2015). Esta abordagem permitiu a análise de milhares de genes expressados numa única experiência. Esta técnica permite, então, analisar transcriptomas de linfócitos neoplásicos, comparando-os com a população de linfócitos normal, o que pode ajudar a definir os mecanismos patogénicos subjacentes ao do desenvolvimento tumoral. Tal foi demonstrado num artigo publicado em LBDCG canino, em que numa amostra de 23 tumores e 10 amostras controlo foram expressos um total de 3286 genes de forma diferente, sendo que a maioria estava sub-expresso em LBDCG, quando comparada com linfócitos normais (n= 2360). Outra vantagem consiste na identificação de “assinaturas específicas”, úteis na classificação molecular de tumores que pareceriam similares tendo como base aspectos morfológicos. Recentemente, o mapeamento genético do LBDCG canino demonstrou dois subtipos biologicamente distintos. (Ferraresso *et al.*, 2014). Este tipo de abordagem já tinha sido utilizada em medicina humana há cerca de 20 anos, e permitiu separar o LBDCG humano em dois subtipos: um caracteriza-se pela expressão de genes típicos de células B do centro germinativo (CG) e outro pela expressão de genes que estavam sobre-expressos em células B activadas (CBA). Pacientes com LBDCG-CG e LBDCG-CBA têm taxas de sobrevivência após quimioterapia significativamente diferentes, já que pacientes com LBDCG-CG respondem favoravelmente a rituximab e quimioterapia, mas uma percentagem superior a 50% dos doentes com LBDCG-CBA sucumbe à doença (Alizadeh *et al.*, 2000). Este primeiro estudo conduziu à proposta de que LBDCG-CG e LBDCG-CBA representam duas entidades biológicas distintas. Do mesmo modo, em 2014, Richards *et al.* apresentam um estudo que aplica as técnicas de microarranjo de ADN num grupo de cães com BCL, 32 dos quais eram LBDCG. Descobriu-se, então, que genes que distinguem LBDCG-CBA e CG humano separam, também, os linfomas B caninos em 2 grupos, que apresentam dois tempos de sobrevivência estatisticamente diferentes (Richards *et al.*, 2013). Por fim, uma lista dos genes mais significantes foi estudada e descobriu-se que estavam envolvidas nas mesmas vias e

processos do LBDCG humano, dos quais o NF- κ B signaling e o receptor de células B signaling foram os mais relevantes (Aresu et al., 2016).

7.1.3. A Patogénese do LBDCG

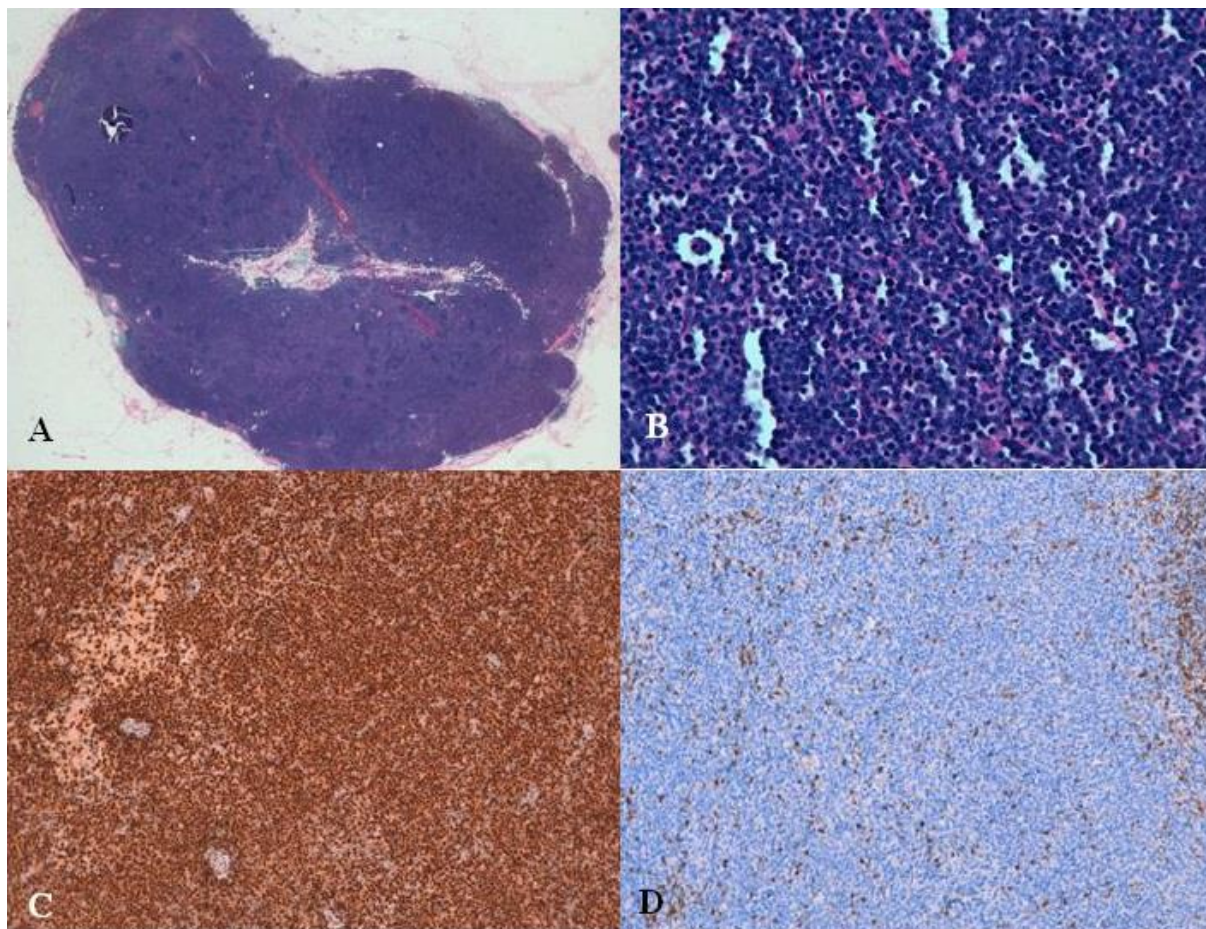
Como já foi referido, o LBDCG é uma das formas mais agressivas e comuns do LnH (Figura 10). O envolvimento das subpopulações de linfócitos na patogénese de LBDCG tem recentemente ganho atenção para a importância da constante “comunicação” entre células B neoplásicas e células T. Acredita-se que as interações das células B e T modifiquem o desenrolar clínico da doença, predominantemente pela regulação da expansão, diferenciação e sobrevivência das células B do linfoma (Yin *et al.*, 2014). Em pacientes com linfoma, uma resposta imunitária anti-tumoral é provavelmente mediada pelas células T (Voskoboinik, *et al.*, 2015). Tendo isto em conta, uma baixa contagem de linfócitos ou a proporção “errada” de células B e T, pode ser uma causa importante na “incapacidade” de defesa anti-tumoral, favorecendo o desenvolvimento e progressão do linfoma. De acordo com esta conclusão, demonstrou-se a presença de linfopenia e uma diminuição significativa na percentagem de células apoptóticas exclusivamente em grupos de alto risco de pacientes com LBDCG recém-diagnosticados (Rusak, *et al.*, 2016).

As células T reguladoras (Tregs) parecem desempenhar um papel importante na regulação de linfócitos B tanto normais como malignos (Rusak *et al.*, 2016) e recentemente descobriu-se que linfopenia “prevê” relapso em pacientes com LBDCG (Wei *et al.*, 2014).

De acordo com a literatura existente, as células Tregs desempenham uma função crucial nas reações imunitárias do hospedeiro contra LBDCG (Rusak, *et al.*, 2016). Sabe-se que os Tregs exibem capacidade imunossupressora contra células T, células B, monócitos e células dendríticas (Rusak, *et al.*, 2016). Por interferência com a maturação de células dendríticas, os Treg podem, também, inibir indirectamente células T efectoras. Como os Tregs são capazes de suprimir o ataque imunitário anti-tumoral, muitas vezes são considerados uma desvantagem em pacientes com cancro. Tem-se demonstrado a presença de Tregs em áreas tumorais da maioria dos tipos de neoplasia (Shang, *et al.*, 2015), e um aumento do número de Tregs infiltrados no tumor é associado a um pior prognóstico para a maioria dos pacientes com tumores não hematopoiéticos. Por outro lado, pacientes com tumores de células B, que têm um aumento de Tregs infiltrados no tumor, têm um melhor prognóstico quando tratados que aqueles com números inferiores (Rusak, *et al.*, 2016). A razão para este “acontecimento” não é clara, contudo, alguma informação indica que os Tregs podem ter uma função dupla em pacientes com neoplasias de células B. Para além da sua capacidade para suprimir a resposta

de células T, tem sido sugerido que os Tregs possam regular as neoplasias de células B através de “perforinas/granzimas” (Voskoboinik, *et al.*, 2015) ou pela interação FaS-FasL (Rusak *et al.*, 2016). Como os Tregs expressam marcadores citoiticos e são capazes de matar células B malignas, parecem ser benéficos para pacientes com linfoma. Recentemente, mostrou-se que a presença de um aumento da percentagem de Tregs FoxP3 positivos infiltrados no tumor em LBDCG está associado a melhor prognóstico (Li *et al.*, 2015).

Figura 10 - Representação de Linfoma Multicêntrico, classificado de acordo com o esquema de classificação da OMS como LBDCG - Imunoblástica⁹



- A. Biópsia de linfonodo poplíteo de ampliação 20x (coloração Hematoxilina-Eosina– H&E), onde é observado o padrão de distribuição difuso dos linfócitos neoplásicos
- B. Imagem histológica do mesmo linfonodo representado em A, de ampliação 400x (coloração H&E)
- C. Imagem de Imunohistoquímica (IHQ) do mesmo linfonodo representado em A, de ampliação 100x (anticorpo anti-Pax5) revelando o padrão de distribuição de difuso das células B
- D. Imagem de IHQ do mesmo linfonodo, de ampliação 100x (anticorpo anti-CD3), revelando a presença de apenas alguns linfócitos T entre os Linfócitos B neoplásicos

⁹ Fotografias gentilmente cedidas pelo Dr. Ricardo Felisberto

8. Diagnóstico

O diagnóstico de linfoma é, geralmente, simples e intuitivo. Contudo, os sinais clínicos são extremamente variáveis, dependendo não só da localização da doença e sua progressão, como também da extensão da lesão e envolvimento orgânico (Vail & Thamm, 2005; Vail *et al.*, 2013).

A confirmação diagnóstica de linfoma deve incluir: o exame físico, obtenção de amostras para estudo citológico e histológico da lesão, hemograma completo, perfil bioquímico e urianálise (Kudnig *et al.*, 2012; Vail *et al.*, 2013).

No entanto, para definir a entidade específica de linfoma presente, é necessário utilizar técnicas diagnósticas mais específicas, como a imunofenotipagem.

8.1. História e Sinais Clínicos

Na maioria dos casos de linfoma multicêntrico, os cães apresentam-se à consulta sem qualquer sintomatologia (sub-estadio “a” segundo a OMS). No entanto, 20% a 40% tem história de sinais clínicos inespecíficos, como perda de peso, anorexia, letargia e episódios febris e linfadenopatia generalizada, não dolorosa e não associada a febre (sub-estadio “b” segundo a OMS) (Couto *et al.*, 2009; Vail *et al.*, 2013).

O exame físico deve ser feito de forma rigorosa e sistemática e incluir a palpação de todos os linfonodos acessíveis, incluindo um exame rectal. Devem, também, ser observadas as membranas mucosas para detecção de palidez, icterícia, petéquias ou ulceração, sinais que podem indicar anemia, neutropénia ou trombocitopénia secundária a mieloptose, doença imunomediada, falha orgânica ou urémia. Outras alterações que se podem identificar secundárias à infiltração neoplásica da medula óssea, incluem febre, sépsis, hemorragia e a presença linfócitos atípicos no esfregaço de sangue. A palpação abdominal pode revelar organomegália (aproximadamente 50% dos cães apresenta esplenomegália), espessamento das paredes intestinais ou linfadenopatia mesentérica. Achados sugestivos de linfoma durante a auscultação torácica incluem taquipneia e/ou dispneia e abafamento dos sons cardíacos, sinais sugestivos de massas mediastínicas ou derrame pleural. É, ainda, observada infiltração difusa pulmonar em 27% a 34% dos casos de linfoma multicêntrico, alteração detectada por radiografia. O exame ocular com fundoscópio pode revelar alterações como uveíte, hemorragia da retina ou infiltração ocular, que ocorre em 1/3 a 1/2 dos cães com linfoma (Vail & Thamm, 2005, Valli *et al.*, 2013).

Pode, também, verificar-se a presença de edema sub-cutâneo por compromisso da drenagem linfática, sendo os restantes sintomas muito variáveis, consoante os órgãos afectados e a presença de síndromes para-neoplásicas como a hipercalcémia. Pensa-se que esta seja originada por uma hormona produzida pelas células neoplásicas que é semelhante à hormona da paratiroide, a PTHrP (*parathyroid hormone-related protein*) (Vail & Thamm, 2005; Couto *et al.*, 2009; Vail *et al.*, 2013).

Cães com linfoma extranodal apresentam, sobretudo, sinais clínicos relacionados com a localização da neoplasia e alterações como poliúria e polidipsia, remetendo-nos para prováveis alterações renais ou hipercalcémia (Vail & Thamm, 2005; Vail *et al.*, 2013).

Em casos de linfoma do SNC pode haver história de convulsões, paralisia ou parésia, consoante o envolvimento seja focal ou multifocal e a progressão da própria doença (Dallman & Saunders, 1986; Couto *et al.*, 2009). Finalmente, na forma cutânea, existe uma grande diversidade de sintomas, podendo haver lesões focais, multifocais, generalizadas e por vezes pruríticas (Jacobs *et al.*, 2002; Vail *et al.*, 2013).

Num estudo conduzido por Aresu *et al.*, 2014, observou-se uma relação estatisticamente relevante entre o grupo morfológico e o sub-estadio. Assim, 22,2% dos cães que apresentava linfoma de células B agressivo e 40% dos cães que apresentava linfoma B indolente eram sintomáticos na altura do diagnóstico. Agrupando os casos com base no seu fenótipo (T ou B), o fígado estava mais frequentemente afectado em LCB (linfoma de células B) e menos frequentemente a medula óssea. Não se encontrou um órgão afectado de forma preferencial entre células B dentro dos estadios clínicos. Cães com LCB de estadio V tinham os linfonodos intratorácicos mais comumente envolvidos e menos vezes envolviam órgãos ou tecidos não linfóides extranodais.

Clinicamente, a maioria dos cães afectados por LBDCG apresentam uma hipertrofia moderada a grave dos linfonodos periféricos, com apresentação multicêntrica (Figura 11) (Aresu, 2016).

Figura 11 – Linfadenomegália submandibular, retrofaríngea e pré-escapular (setas)¹⁰



8.2. Diagnóstico Laboratorial

A maior parte dos cães com linfoma apresenta valores de hemograma normais no momento do diagnóstico. Ainda assim, cerca de 1/3 dos animais apresenta anemia, que representa a alteração hematológica mais comum associada ao linfoma. Esta caracteriza-se por ser uma anemia não regenerativa típica de doença crônica, ou seja, normocrômica e normocítica. Mais raramente pode ocorrer hemorragia e/ou anemia hemolítica concomitante e por isso estes animais apresentam anemia regenerativa (Vail *et al.*, 2013).

Em animais com anemia ou evidência de hemorragia, para além de contagem de plaquetas, deve também ser realizada contagem de reticulócitos e testes de coagulação. Verifica-se que 30% a 50% dos casos apresenta trombocitopénia, embora a ocorrência de hemorragia espontânea seja extremamente rara (Jacobs *et al.*, 2002). Adicionalmente, em casos de mieloptose significativa, a anemia pode ser acompanhada por trombocitopénia e leucopenia. A presença de linfócitos atípicos circulantes pode indicar envolvimento da medula óssea e leucemia. Contudo, estas alterações são raras (Jacobs *et al.*, 2002). Pode ser encontrada neutrofilia em 25% a 40% dos casos, linfocitose e linfopénia ocorrem em aproximadamente 20% dos cães (respectivamente) (Vail *et al.*, 2013).

Em animais assintomáticos, o perfil bioquímico básico (ALT, FAS, GGT, UREIA, CREA, GLU, ALB, PT) está frequentemente normal. Contudo, e consoante a extensão das lesões,

¹⁰ Fotografia gentilmente cedida por Dr. Joaquim Henriques

este pode revelar alguns indicadores de falha orgânica, como alterações da função hepática, renal, ou outras (Vail & Thamm, 2005; Vail *et al.*, 2013). A hipoproteinémia é observada mais frequentemente em animais com linfoma gastrointestinal. Em cães que revelam aumento das proteínas totais ou evidência de aumento da fracção de globulinas devem avaliar-se as proteínas séricas por electroforese do soro. Gamopatias monoclonais têm sido referidas em 6% dos cães com linfoma (Vail *et al.*, 2013). Anomalias bioquímicas do soro muitas vezes reflectem a localização anatómica envolvida, bem como síndromes paraneoplásicas como hipercalcemia. O aumento das concentrações de seroglobulinas, muitas vezes monoclonais, ocorre frequentemente em LCB. (Valli, 2013).

8.3. Urianálise

A urianálise providencia informação sobre a função renal e do trato urinário. É importante referir que isoestenúria em cães com azotémia e hipercalcémia (já anteriormente referida) não justifica, por si só, uma patologia renal, já que valores elevados de cálcio interferem com a capacidade de concentração tubular, devido a falhas no controlo da hormona antidiurética (ADH) (Vail & Thamm, 2005; Vail *et al.*, 2013).

8.4. Imagiologia

Os exames imagiológicos, como a radiografia, ultrassonografia ou tomografia axial computadorizada (TAC), constituem ferramentas úteis para a abordagem diagnóstica diferencial e estadiamento clínico de linfoma, determinando a extensão da doença. Os resultados da investigação imagiológica são, na maioria dos casos, extremamente valiosos, podendo afectar o prognóstico e a decisão terapêutica (Vail *et al.*, 2013; Bryan, 2010). Em todos os pacientes oncológicos e para um estadiamento adequado da doença, devem ser realizados 3 planos radiográficos de tórax: projecção em decúbito lateral esquerdo, direito e uma projecção ventro-dorsal (Vail *et al.*, 2013).

A avaliação radiográfica das cavidades torácica e abdominal constituem ferramentas importantes para determinar o envolvimento dos órgãos internos. Aproximadamente 60% a 75% dos cães com linfoma multicêntrico apresenta anomalias nas radiografias torácicas, cerca de 1/3 tem evidência de infiltrados pulmonares e 2/3 apresenta linfadenopatia torácica (linfonodos esternais e traqueobrônquicos) e alargamento do mediastino cranial (Higginbotham *et al.*, 2010; Marconato *et al.*, 2011). A linfadenopatia do mediastino cranial é detectada em 20% dos cães com linfoma, e está relacionada com um factor de prognóstico negativo, em relação ao tempo de remissão e ao tempo de sobrevida (Vail & Thamm, 2005).

Os infiltrados pulmonares normalmente são representados por um padrão alveolar e/ou intersticial. Contudo, embora raramente, também podem surgir nódulos e infiltrados brônquicos e também pode estar presente efusão pleural (Vail *et al.*, 2013).

No que diz respeito aos exames imagiológicos abdominais, 50% dos casos pode revelar envolvimento do linfonodo ilíaco medial e/ou dos linfonodos entéricos, baço ou fígado (Higginbotham *et al.*, 2010).

No caso de existirem sinais clínicos relacionados com patologia abdominal, deve ser realizada uma investigação imagiológica mais pormenorizada, nomeadamente com o auxílio de ultrassonografia, na qual podem ser obtidas amostras intra-abdominais ecoguiadas para diagnóstico, através de punção aspirativa com agulha fina ou biopsia ecoguiada com trocarer. Este exame é, assim, útil no diagnóstico de linfoma com origem em regiões do organismo não exploráveis ao exame físico, como linfoma GI, abdominal nodal e hepato-esplénico e, ainda, na avaliação da resposta à terapia (Vail *et al.*, 2013).

A utilização de modalidades imagiológicas mais avançadas como endoscopia, tomografia computadorizada e ressonância magnética, tem-se tornado cada vez mais frequente em medicina veterinária, contribuindo para uma melhor avaliação da extensão da doença (Blackwood *et al.*, 1997; North *et al.*, 2009)

8.5. Avaliação da medula óssea

A avaliação da medula óssea é efectuada por punção aspirativa com agulha fina ou biopsia e é recomendada para se efectuar um estadiamento mais completo da doença e definição do prognóstico. Está indicada em cães que apresentem anemia, linfocitose, linfócitos atípicos no sangue periférico ou outras citopénias periféricas (Carter *et al.*, 1990; Marconato *et al.*, 2013). A presença de formas imaturas de linfócitos grandes com nucléolos em circulação pode indicar o envolvimento da medula óssea. É importante lembrar que estas células também podem ser observadas em parasitismo GI, anemia hemolítica imunomediada e outras doenças imunomediadas ou infecciosas. Um valor de 3% de infiltração por células neoplásicas da medula óssea foi definido como o “cut-off” mais útil e fidedigno em cães com LBDCG para discriminar infiltração da medula óssea. Por isso, o TS e PP têm sido significativamente associado a este valor (Aresu *et al.*, 2016).

8.6. Estadiamento

Tabela 3 – Sistema de estadiamento clínico do linfoma das espécies domésticas de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (Vail et. al, 2013)

Sistema de estadiamento de linfoma para as espécies domésticas de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS)

Estadio	
I.	Envolvimento limitado a um único linfonodo ou tecido linfoide associado a um órgão (excluindo medula óssea)
II.	Envolvimento de vários linfonodos de uma determinada região
III.	Envolvimento ganglionar generalizado
IV.	Envolvimento esplênico e/ou hepático (+/- Estadio III)
V.	Manifestação no sangue e envolvimento da medula óssea e/ou outro sistema do organismo (+/- estadio I-IV)
Subclassificação	
a	Sem sinais sistémicos
b	Com sinais sistémicos

Após estabelecimento do diagnóstico, deve ser determinada a extensão da doença. A maioria dos cães, mais de 80%, apresenta um estadio avançado (III – IV). O diagnóstico imagiológico e avaliação do envolvimento da medula óssea devem ser indicados para estadiamento. O nível de “aprofundamento do estadiamento” implementado depende se o resultado vai alterar o plano terapêutico, se a informação é importante para o prognóstico e se o cliente precisa de saber o estadio antes de iniciar (ou não) o plano de tratamento (Valli *et al.*, 2013).

De acordo com Aresu *et al.*, 2013, 66,7% dos cães assintomáticos apresentavam doença de estadio IV (sub-estadio a) enquanto 70,0% dos cães sintomáticos apresentavam estadio V (sub-estadio b). Por fim, 74% dos cães com níveis elevados de Lactato Desidrogenase (LDH) apresentavam doença de estadio IV. Está documentado que uma elevada actividade da LDH está correlacionada com a extensão tumoral em pessoas com LBDCG (Aresu *et al.*, 2013).

9. Tratamento

9.1. Quimioterapia

É de suma importância conseguir um diagnóstico preciso, o que conduzirá a protocolos quimioterápicos para histotipos específicos de linfoma, desenhados para cada paciente, o que levará, em última análise, a um aumento do tempo de sobrevivência dos pacientes (Aresu *et al.*, 2014). O linfoma é a neoplasia canina mais frequentemente tratada com quimioterapia (Valli *et al.*, 2013).

Sendo o linfoma uma doença sistêmica, na grande maioria dos casos é necessário realizar quimioterapia sistêmica. Existem vários protocolos de quimioterapia utilizados no tratamento de linfoma. Existem protocolos que utilizam apenas um único agente e protocolos que combinam vários fármacos, sendo o Wisconsin Madison (WM) o mais utilizado actualmente e o que apresenta melhores taxas de sobrevivência e remissão (Vail *et al.*, 2013).

A abordagem terapêutica do doente com linfoma deve ter em consideração o estadio e sub-estadio da doença, a coexistência ou não de síndromes paraneoplásicas, o estado fisiológico do paciente e a relação com possíveis efeitos secundários e o compromisso do proprietário (Vail *et al.*, 2013). Sem tratamento, o tempo de sobrevivência é em média inferior a 10 semanas. Por outro lado, estima-se que 80% a 90% dos cães atinjam tempos de sobrevivência médios de 12 meses com a realização de protocolos específicos constituídos por vários fármacos (Argyle *et al.*, 2008; Vail *et al.*, 2013). Os animais adultos tendem a atingir tempos de sobrevivência superiores aos dos jovens (Jacobs *et al.*, 2002; Turek *et al.*, 2008). Protocolos constituídos por vários fármacos apresentam, então, uma eficácia superior no tratamento de linfoma, conseguindo tempos de remissão superiores comparativamente a protocolos de agente único. Contudo, clinicamente são mais agressivos e, também, mais dispendiosos. Os protocolos de agente único são normalmente considerados protocolos paliativos, excepto os que utilizam a doxorrubicina (DOX), já que embora apresentem resposta e tempos de remissão inferiores a protocolos de múltiplos agentes, são menos dispendiosos, menos tóxicos e requerem menos visitas ao médico veterinário (Vail *et al.*, 2013).

Os principais objectivos da quimioterapia são os de induzir uma primeira remissão completa (RC) e duradoura (superior a 6 meses), a *fase de indução*; reinduzir a remissão após ocorrer o relapso do tumor, a *fase de reindução*; e finalmente induzir nova remissão quando a indução e reindução não conseguem obter uma boa resposta, com um protocolo diferente do inicial, a *fase de resgate* (Vail *et al.*, 2013).

Relativamente à resposta ao tratamento, num estudo conduzido por Aresu *et al.*, 2014, cães com linfoma agressivo de células B (como LBDCG) tinham maior probabilidade de alcançar remissão completa, e um maior tempo de Lymphoma Specific Survival (LSS) quando comparados com linfomas de células T ou linfomas de células B indolentes. O mesmo já está descrito em medicina humana. Com algumas exceções, linfomas multicêntricos de células B estão associados a uma taxa de resposta inicial semelhante a LCT multicêntricos, mas com uma durabilidade de resposta mais elevada, seguindo protocolos de quimioterapia (como CHOP) (Vail *et al.*, 2013).

9.1.1. Protocolo CHOP

O protocolo terapêutico mais utilizado no tratamento no LBDCG canino é o designado “CHOP”, cujas letras representam os seguintes fármacos: Ciclofosfamida (C), Doxorubicina (H, hidroxidaunorubicina), Vincristina (O, Oncovin), e Prednisolona (P) (Burton *et al.*, 2013). Está descrito que cerca de 80-90% dos animais obtêm resposta completa ao tratamento, e que o tempo médio de sobrevivência é de aproximadamente 12 meses (Lori *et al.*, 2010) e cerca de 20% a 25% dos cães vive 2 anos ou mais, após iniciar o tratamento com este protocolo (Vail *et al.*, 2013).

De acordo com a bibliografia existente, este é o protocolo que oferece maior tempo de remissão. A teoria subjacente é a de que estes fármacos, usados em simultâneo no mesmo plano terapêutico, têm diferentes mecanismos de acção e atuam em diferentes fases do ciclo celular, aumentando assim a taxa de resposta terapêutica (Burton *et al.*, 2013).

O protocolo CHOP pode ser de baixa ou alta dose, e de curta ou longa duração. Um exemplo de um protocolo CHOP é o da Universidade de Wisconsin Madison (Tabela 4) (Turek *et al.*, 2008; Vail *et al.*, 2013).

Tabela 4 – Protocolo CHOP curto, de 19 semanas, da universidade de Wisconsin-Madison (Adaptado de Turek et al., 2008)

Protocolo	Semana																	
	1	2	3	4	6	7	8	9	11	12	13	14	16	17	18	19		
A – Vincristina	X		X		X		X		X		X		X		X			
B – Ciclofosfamida		X				X				X				X				
C – Doxorrubicina				X				X				X				X		
D – Prednisona	X	X	X	X														

A. Vincristina (0,5-0,7 mg/m² IV)

B. Ciclofosfamida (250 mg/m² PO dividido por 2-4 dias)

C. Doxorrubicina (30 mg/m² ou 1mg/kg se <10Kg IV) – Administrar em 30 ml de solução salina 0,9%, durante 30 minutos

D. Prednisona – 2 mg/Kg PO q24h, 7 dias; 1,5 mg/Kg PO q24h, nos 7 dias seguintes; 1 mg/Kg PO q24h nos 7 dias seguintes; 0,5 mg/Kg PO q24h nos 7 dias seguintes

Neste protocolo, a quimioterapia é descontinuada na semana 19 de tratamento, caso o animal se encontre em remissão completa. Após a descontinuação da quimioterapia, os animais devem ser reavaliados mensalmente, devendo realizar-se um exame físico, atentando especialmente em alterações como linfadenomegália, ou outras que indiquem progressão da doença ou saída de remissão (Valli *et al.*, 2011).

No entanto, Garrett *et al.*, 2002, afirmam que em protocolos que conjugam agentes múltiplos, incluindo a Doxorrubicina, a fase de manutenção não traz vantagens significativas quanto à sobrevivência dos doentes. Do mesmo modo, Chun *et al.*, 2009, afirma que a utilização da fase de manutenção prolongada não está recomendada, já que esta implica um custo mais elevado, uma maior toxicidade e maior probabilidade de desenvolvimento de resistência aos fármacos.

9.2. Reindução e Quimioterapia de Resgate

Na grande maioria dos cães que alcança remissão, a neoplasia relapsa. Isto, normalmente, associa-se à presença de clones tumorais ou de células estaminais tumorais (Ito *et al.*, 2011), que são inerentemente resistentes à quimioterapia. Estas células são denominadas “clones MDR” (RMF em português, resistência a múltiplos fármacos), células que já inicialmente eram mais resistentes ou que, assim, se tornaram após exposição aos agentes quimioterápicos seleccionados (Vail *et al.*, 2013).

No primeiro *relapso* da neoplasia, é recomendada a utilização do protocolo quimioterápico inicial, ou seja de *indução*, com especial atenção atribuída à dose máxima cumulativa de

Doxorrubicina (Garrett *et al.*, 2002) e desde que o relapso se tenha dado temporalmente distante da conclusão do mesmo (> 2 meses). Em geral, o tempo de reindução vai ser metade do encontrado na primeira abordagem terapêutica. Espera-se que quase 80% a 90% dos animais, que tenham concluído o protocolo inicial de CHOP, alcancem reindução da remissão (Flory *et al.*, 2011).

Se a *reindução* falhar, ou o paciente não responder à *indução* inicial, o uso de agentes ou protocolos de “resgate” podem ser aplicados. Existem protocolos de fármaco único ou combinados que não são tipicamente encontrados no protocolo CHOP, e que são “guardados” para ser utilizados nestes casos de resistência a fármacos. Os protocolos de resgate mais comumente utilizados incluem o uso singular ou combinado de actinomicina D, mitoxantrona, doxorrubicina (se não tiver sido utilizada no protocolo original), dacarbazina (DTIC), temozolomida, lomustina (CCNU), L-asparaginase, mecloretamina, vincristina, vinblastina, procarbazina, prednisona e etoposido (Turek *et al.*, 2008; Vail *et al.*, 2013).

Geralmente, as taxas de resgate encontram-se na ordem dos 40 a 50%, embora as respostas não sejam normalmente duradouras, sendo o tempo médio das respostas de 1,5 a 2,5 meses, independentemente da complexidade do protocolo utilizado. Uma pequena percentagem (<20%) dos animais alcança tempos de resgate mais longos (Saba *et al.*, 2009).

9.3. Imunoterapia

A imunoterapia activa direcciona a capacidade protectora do sistema imunitário para eliminar células malignas, estabelecendo uma imunidade anti-tumoral duradoura, pela sua capacidade de exibir memória (Marconato *et al.*, 2015)

Recentemente, imunoterapia combinada com quimioterapia demonstra prolongar o TTP e o LSS em cães com LBDCG (Marconato *et al.*, 2014). De um total de 19 cães que realizaram quimioterapia, 12 realizaram imunoterapia (vacina) e 7 receberam tratamento placebo. Todos os 12 (71,4%) vacinados alcançaram remissão completa, enquanto dos 7 do grupo de controlo, 2 (28,6%) não alcançaram remissão. Quatro dos 12 cães vacinados nunca tiveram relapso da neoplasia, após 648, 613, 342 e 154 dias, respetivamente. O primeiro TTP foi significativamente maior no grupo em estudo, quando comparado com o grupo de controlo. A mediana para o primeiro TTP, para o grupo vacinado, foi de 304 dias (média: 332, intervalo: 154-648 dias), e de 41 dias (média: 59 dias, intervalo: 19-140 dias) para o grupo de controlo. A mediana do LSS no grupo vacinado foi de 505 dias (média: 468 dias), versus 159 dias (média: 136 dias) para o grupo de controlo (Marconato *et al.*, 2014).

Contudo, uma possível desvantagem da imunoterapia activa é a sua dependência do sistema imunológico do paciente, já que este pode estar comprometido por acção do próprio tumor. É importante identificar biomarcadores, que possam ser utilizados para prever a resposta ao tratamento, permitindo estratificar os pacientes em grupos de tratamento (Marconato *et al.*, 2015).

9.3.1. Anticorpos Monoclonais

Na década passada, alcançou-se um aumento da duração da primeira remissão em humanos com LCB, através da instituição de terapias baseadas em anticorpos monoclonais, o chamado protocolo R-CHOP, sendo R (Rituximab®) um anticorpo recombinante direccionado ao antígeno CD20, uma proteína transmembranar hidrofóbica encontrada em linfócitos pré B ou B maduros. Infelizmente, o rituximab não tem efeito terapêutico em cães, por falta de reconhecimento externo de um antígeno similar nas células de linfoma canino e da inerente antigenicidade de anticorpos humano-derivados nos cães (Impellizeri *et al.*, 2006).

9.3.2. Vacinas Anti Tumoriais

Novas terapias promissoras, como a utilização de vacinas, representam uma das oportunidades mais entusiasmantes em oncologia humana e veterinária. (Marconato *et al.*, 2015). A imunoterapia activa é uma estratégia anti-tumoral promissora. Contudo, o seu uso combinado com imunoterapia em cães com LBDCG permanece largamente desconhecido. As “Heat Shock Proteins Peptide Chaperone” (HSPPC) permitem a imunização do hospedeiro, contra um vasto reportório de antígenos associados a tumor. O “Hydroxylapatite” funciona como um excipiente das HSPPC e age como adjuvante imunológico. Marconato *et al.*, 2014 realizou um estudo onde conclui que a vacina autóloga “hydroxylapatite” e HSPPC derivados do tumor não só era segura, como é terapeuticamente efectiva em cães com LBDCG. Este trabalho incluía 19 cães com LBDCG, num estudo prospectivo com controlo placebo, que comparava terapêutica com quimioterapia e vacina “HSPPC-Hydroxylapatite” com tratamento apenas com quimioterapia. O TP médio dos animais que realizaram a vacina foi de 304 dias, comparativamente ao grupo de controlo cujo TP foi de apenas 41 dias. Também houve uma diferença significativa na duração da segunda remissão. Quanto ao LSS, este foi de 505 dias para os animais vacinados, versus 159 para os não vacinados. Verificou-se que 6 dos cães alcançaram remissão molecular, e quanto a efeitos secundários, a ocorrência foi igual nos dois grupos. Os resultados deste estudo mostram que a vacina autóloga testada é segura e prolonga eficazmente o TP e LSS em cães com LBDCG, quando utilizada em combinação com quimioterapia de alta dose (Marconato *et al.*, 2014).

9.4. Efeitos Adversos Secundários

A maioria dos agentes quimioterápicos é constituída por fármacos não selectivos, que provocam a destruição tanto de células tumorais como de algumas células normais (Couto *et al.*, 2009). Esta toxicidade está, geralmente, associada a órgãos nos quais a divisão celular é mais rápida, como são exemplos a medula óssea e enterócitos, sendo por isso a mielossupressão e a toxicidade gastrointestinal os efeitos adversos mais frequentes. Outras alterações associadas à administração de quimioterapia incluem toxicidade dermatológica, pulmonar, cardíaca, neurotoxicidade, urotoxicidade, hepatopatoxicidade, reacções anafilácticas e pancreatite (Couto *et al.*, 2009; Vail *et al.*, 2013). Para além das alterações provocadas nos diferentes órgãos, a rápida morte de células tumorais pode desencadear alterações metabólicas repentinas, provocando sinais clínicos agudos como prostração, vômito e diarreia, mimetizando assim a toxicidade do fármaco. Esta síndrome é denominada por “síndrome da lise tumoral aguda” (Couto *et al.*, 2009).

Um trabalho recente realizado por Tomiyasu *et al.*, 2010, avaliou efeitos adversos segundo a terminologia de critérios de efeitos adversos do grupo cooperativo de oncologia veterinária (VCOG-CTCAE) (tabela 5). Após analisar 40 cães com linfoma multicêntrico, concluiu-se que a toxicidade associada à VCR foi semelhante à observada para a DOX e Ciclofosfamida (CICLO), num protocolo de múltiplos agentes. Curiosamente, foram registados mais efeitos secundários associados à primeira administração de VCR do que a DOX, especialmente em pacientes com doença de grau V. Neste mesmo trabalho, detectaram-se alterações sanguíneas e de medula óssea (como neutropénia e trombocitopénia) em 57,5%, 41% e 8,1% dos animais tratados com VCR, CICLO e DOX (respectivamente). Quanto a alterações gastrointestinais, aproximadamente metade dos 40 cães tratados para linfoma apresentaram alterações gastrointestinais como vômitos, diarreia ou perda de apetite.

Um estudo realizado por Vaughan *et al.* em 2007, demonstrou que cães que desenvolveram neutropénia pós-quimioterapia, e que tiveram, por isso, um atraso ou redução da dose de quimioterapia, alcançaram uma primeira remissão superior, quando comparados com cães que não tinham desenvolvido neutropénia, e que foram sujeitos a protocolos quimioterápicos com doses superiores. Este artigo permite-nos reflectir sobre a necessidade de realizar protocolos com doses quimioterápicas tão elevadas, mesmo em animais que não desenvolvem este tipo de efeitos secundários, e remete-nos, ainda, para a necessidade de considerar uma diminuição das doses destes fármacos (Vaughan *et al.*, 2007). Com o mesmo intuito, foi avaliada a utilização de protocolo CHOP de 15 semanas, no qual cães que, apresentaram efeitos adversos e necessitaram de adiar os tratamentos quimioterápicos, apresentaram também tempos livres

de doença superiores, quando comparados com os restantes animais do estudo. Estes resultados revelam a necessidade de realizar estudos que avaliem protocolos com doses quimioterápicas específicas para cada doente (Burton *et al.*, 2012).

Tabela 5 – Efeitos adversos secundários à quimioterapia, com base no VCOG-CTCAE (Adaptado de Tomiyasu et al., 2010)

	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Grau 5
Alterações Gastrointestinais				
Vómito	3-5 vezes/dia; <3 vezes/dia por > de 2 dias; Fluidoterapia IV ou SC indicada	>5vezes/dia; > 4 dias; Fluidoterapia IV indicada	Risco de vida; (ex: Colapso Hemodinâmico)	Morte
Diarreia	Aumento de 2-6 defecações / dia (a cima do normal); Sem interferência na qualidade de vida	Aumento de > 6 defecações / dia (a cima do normal); Incontinência; Fluidoterapia IV indicada; Interferência na qualidade de vida	Risco de vida; (ex: Colapso Hemodinâmico)	Morte
Perda de Appetite	Diminuição da ingestão (<3 dias) sem perda de peso significativa; Suplementos nutricionais orais indicados	Duração 3-5 dias; Perda de peso significativa; Fluidoterapia IV, Tudo de alimentação ou nutrição parenteral indicadas.	Risco de vida > 5 dias de duração	Morte
Alterações Hematológicas				
Neutropénia	1500–2900/ μ l	1000–1499/ μ l	500–999/ μ l	<500/ μ l
Trombocitopénia	100000-200000/ μ l	50000–99000/ μ l	25000–49000/ μ l	<25000/ μ l

10. Prognóstico

Embora sejam raros os casos de cura de linfoma (< 10%), é frequente conseguir-se uma remissão completa com boa qualidade de vida e tempo de sobrevida (Vail *et al.*, 2013).

São vários e variados os fatores que influenciam a evolução da doença, embora muitos deles sejam controversos, tornando o prognóstico bastante variável e difícil de prever (Vail *et al.*, 2013). Como já foi referido anteriormente, um paciente que não realize tratamento apresenta um mau prognóstico, esperando-se um tempo de sobrevida inferior a 10 semanas (Jacobs *et al.*, 2002). Por outro lado, a quimioterapia com múltiplos fármacos está associada a um melhor prognóstico, comparativamente a protocolos com um único fármaco (Turek *et al.*, 2008).

Os fatores de prognóstico mais consistentes para o linfoma no cão são o sub-estadio da OMS, o imunofenótipo celular e a taxa de resposta inicial à quimioterapia (Keller, *et al.*, 1993; Vail *et al.*, 2013). Assim, de acordo com o esquema de classificação da OMS, doentes que apresentem sub-estadio *b*, ou seja, apresentem sinais clínicos na altura do diagnóstico, apresentam tempos de remissão e de sobrevivência inferiores aos de sub-estadio *a* (que não apresentam sinais clínicos) (Chun *et al.*, 2009; Garrett *et al.*, 2002).). Também os estadios mais precoces de linfoma (I e II) estão associados a um melhor prognóstico que os estadios mais avançados (III, IV, V) (Teske *et al.*, 1994, Valli *et al.*, 2013).

Contudo, está descrito que linfomas de médio a alto grau, como a maioria dos LBDCG, centroblasticos ou imunoblasticos, podem apresentar boas taxas de resposta ao tratamento, embora tendam a ter relapsos mais precoces.

A localização anatômica da doença é, também, considerada um potencial fator de prognóstico: linfomas primários localizados, embora raros, tendem a ter melhor prognóstico que as disseminadas. Admite-se, também, a influência negativa de sintomas sistémicos associados ao tumor como a hipercalemia e anemia, envolvimento dos linfonodos mediastínicos, sistema nervoso central, olho ou medula óssea. Verifica-se a associação entre um menor tempo de sobrevida em cães com linfoma e a presença de anemia numa fase inicial do diagnóstico (Miller *et al.*, 2009; Bergman *et al.*, 2012).

Alguns estudos mostram que o género pode ter importância prognóstica, e que fêmeas castradas tendem a ter um melhor prognóstico (Keller *et al.*, 1993).

Outro estudo sugere que história de doença inflamatória crônica de vários tipos prevê uma maior probabilidade de um relapso mais antecipado (Baskin *et al.*, 2000). No entanto, estes indicadores de prognóstico necessitam de mais estudos para ser totalmente confirmados.

Estão, ainda, sugeridos diversos biomarcadores como possíveis indicadores de prognóstico para o linfoma do cão (Aresu *et al.*, 2014; Dhaliwal, *et al.*, 2013; Elliott *et al.*, 2013). Uma das características típicas do desenvolvimento neoplásico é o seu crescimento incontrolável, sendo por isso importante quantificar a proliferação celular no acompanhamento clínico de um doente oncológico. Existem, então, marcadores histoquímicos como a Região Organizadora Nucleolar Argirofílica (AgNOR) e imunohistoquímicos como o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e Ki-67 (Proteína Codificada pelo gene MKI67), que permitem quantificar a proliferação celular neoplásica (Sokolowska *et al.*, 2012). Contudo, os estudos existentes não são concordantes. Em dois trabalhos, cães com tumores com um período curto de replicação, frequência elevada de AgNOR ou alta imunoreactividade a Ki67, tiveram um melhor prognóstico que tumores que apresentavam características inversas (Phillips *et al.*, 2000). Outros estudos mostram que grupos com baixa proliferação tumoral estão associados a melhor prognóstico (Larue *et al.*, 1999). Adicionalmente, um outro estudo refere que a proporção de células tumorais que estava em apoptose demonstrou uma predição modesta do tempo de remissão (Phillips *et al.*, 2000).

Existe, ainda, evidência de que tumores imunoreactivos a CD3, apresentam períodos de remissão e sobrevivência mais curtos. Isto é verdade, principalmente para cães com linfoma multicêntrico, já que o imunofenótipo de linfomas solitários ou extranodais não tem sido aprofundadamente investigado, no que diz respeito ao prognóstico. Adicionalmente, está demonstrado que cães com linfoma de células B, que expressem um nível inferior ao normal de antígeno B5 (expressado em cerca de 95% dos linfócitos não neoplásicos), têm um tempo de remissão e de sobrevida inferiores (Vail *et al.*, 2013).

Para o LBDCG em particular têm sido propostos vários fatores de prognóstico, incluindo o estadio, subestadio (Marconato *et al.*, 2013) e perfil de expressão genética (Richards *et al.*, 2013). No entanto, é preciso encontrar modelos prognósticos adicionais que sejam financeiramente acessíveis, práticos e facilmente interpretados pelos clínicos, de forma a caracterizar cães com prognóstico reservado e a facilitar o seu tratamento (Marconato *et al.*, 2015). Num estudo retrospectivo de cães com linfoma, o aumento da contagem absoluta de monócitos (CAM) e da contagem absoluta de linfócitos (CAL) estavam fortemente associados com a diminuição do PP (Perry *et al.*, 2011). Ainda, em humanos com LBDCG, o rácio CAL/CAM (RLM) ao diagnóstico é um importante factor de prognóstico (Li *et al.*, 2014).

Com base nos resultados do estudo de Marconato *et al.*, um valor de RLM $\leq 1,2$ ao diagnóstico em cães com LBDCG está associado a um PP e TS inferiores, sugerindo que os linfócitos e monócitos podem desempenhar um papel relevante em cães com LBDCG a receber quimio-imunoterapia (Marconato *et al.*, 2015).

Existe uma diferença marcada no tempo de sobrevida em cães com LBDCG consoante a taxa de mitoses. O tempo mediano de sobrevida em cães com menos de 20 mitoses por campo de 400x foi de 188 dias, em contraste, a sobrevida mediana em cães com um número de mitoses superior a 21 por campo de 400x foi de 31 dias (Valli *et al.*, 2013).

10.1. Rácio Neutrófilos/Linfócitos (RNL)

Um estudo realizado em medicina humana mostrou que pacientes com LBDCG com RNL $\geq 3,5$, no momento do diagnóstico, estavam associados a um pior prognóstico, tempo de sobrevida total (TS) e tempo de progressão livre de doença mais curtos (PP), quando comparados com pacientes com RNL $< 3,5$. O rácio N/L, no momento do diagnóstico, foi identificado como sendo uma variável de prognóstico de sobrevivência independente (Porrata *et al.*, 2010). Um estudo semelhante confirmou a sua utilização como indicador de prognóstico, mas obtendo um valor de *cutoff* de 3 no RNL (Wang *et al.*, 2016). No entanto, um estudo realizado em medicina veterinária, com o objectivo de avaliar o valor prognóstico deste rácio em cães com linfoma multicêntrico, concluiu que este não era aplicável de forma significativa na população estudada, não tendo sido obtido um valor de p significativo para o TS e PP (Mutz *et al.*, 2013).

O RNL tem, ainda, aplicabilidade no auxílio no diagnóstico diferencial de neoplasias malignas *versus* neoplasias benignas dos mesmos tecidos, como o sarcoma de tecidos moles (STS – soft tissue sarcoma) *versus* tumor benigno dos tecidos moles (BSTT -benign soft tissue tumor) (Idowu *et al.*, 2012), cancro do pulmão *versus* a situação de pacientes sem cancro (Kemal *et al.*, 2014), neoplasias ováricas *versus* patologia ginecológica benigna (Cho *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2010, Kemal *et al.*, 2014, Macfarlane *et al.*, 2015) e ainda, como factor de prognóstico de sobrevivência em tumores sólidos (Porrata *et al.*, 2010).

A contagem absoluta de linfócitos (CAL) como marcador da imunidade do hospedeiro tem sido reportada como factor prognóstico de sobrevivência em pacientes com LBDCG no momento do diagnóstico, ou após o primeiro relapso. Em vários tumores, a contagem de neutrófilos é um marcador de inflamação, e por isso tem sido relacionada com a sobrevivência (Porrata *et al.*, 2010). A resposta inflamatória sistémica está associada a alterações nos leucócitos circulantes. A linfopenia resulta da marginalização e apoptose acelerada de

linfócitos (Ayala *et al.*, 1996, Hotchkiss *et al.*, 1999), e a neutrofilia é provocada pela apoptose retardada de neutrófilos (Mahidhara *et al.*, 2000). Pensa-se que o RNL reflecta a actividade pro-tumoral e a reduzida resposta imune antitumoral (Kim *et al.*, 2014), podendo ser mais útil do que a contagem individual de linfócitos e de neutrófilos, porque pode revelar flutuações entre estas duas variáveis (Szkandera *et al.*, 2013a) (Macfarlane *et al.*, 2015). Assim, estuda-se o RNL com o objectivo de “comparar” a resposta inflamatória (neutrófilos), originada pelo tumor com a imunidade do hospedeiro (linfócitos) (Porrata *et al.*, 2010).

O RNL alterado pode ser explicado pela inflamação associada à neoplasia (Balkwill *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2006). A inflamação desempenha um papel importante na biologia tumoral, acreditando-se que as células inflamatórias e citocinas libertadas pelas células neoplásicas contribuam para o crescimento do tumor e imunossupressão do hospedeiro (Balkwill *et al.*, 2001). Pensa-se que o mecanismo de resposta inflamatória em neoplasias seja uma resposta inespecífica à hipóxia ou à destruição de tecido. Vários estudos humanos ou veterinários têm utilizado este conhecimento, e investigado marcadores de inflamação sistémica como auxiliares de diagnóstico em neoplasias (Kim *et al.*, 2010; Chase *et al.*, 2012; Idowu *et al.*, 2012; Kemal *et al.*, 2014; Macfarlane *et al.*, 2015).

Fatores inflamatórios de transcrição chave como NF-Kb (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer”) , HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1) e STAT-3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) têm sido associados ao desenvolvimento cancerígeno (Porrata *et al.*, 2010). Em pacientes oncológicos, tem-se mostrado que a proporção de células T helper 2 (Th2) está aumentada, resultando na supressão da imunidade celular (Th1). As próprias células tumorais produzem citocinas imunossupressoras, como TGF-beta e IL-6, que do mesmo modo contribuem para este decréscimo da resposta Th1. A IL-6 é produzida em grandes quantidades por macrófagos, e em humanos os macrófagos associados ao tumor (MAT) têm sido associados a mau prognóstico em pacientes com linfoma (Mutz *et al.*, 2013).

No estudo de Porrata *et al.*, 2010, pacientes com um RNL <3.5, no momento do diagnóstico, apresentavam níveis mais elevados de LDH, neutrofilia, linfopénia, má condição física, estadio III/IV, bem como estavam associados a outros fatores prognósticos relacionados com a inflamação (febre e suores nocturnos). A produção de LDH em linfoma tem sido associada a extensão da neoplasia, tendo-se identificado uma correlação positiva entre o RNL ao diagnóstico e a LDH. Adicionalmente, o RNL ao diagnóstico mostrou-se um factor preditivo de produção de LDH independentemente do estadio. No entanto, a associação entre o RNL e LDH sugere que poderá existir outra fonte de produção de LDH em LBDCG, como a decomposição de tecidos em vez da produção pela inflamação provocada pelo tumor (Porrata

et al., 2010). Este estudo sugere que a determinação do RNL, no momento do diagnóstico, é um factor de prognóstico simples, barato e estandardizável, em doentes com LBDCG (Porrata *et al.*, 2010).

11. A Resposta Inflamatória

Os mecanismos biológicos cruciais pelos quais se dão o desenvolvimento e a progressão tumoral ainda não são completamente compreendidos, sendo por isso necessário identificar fatores prognósticos mais fidedignos e fáceis de aplicar. A inflamação tem sido identificada como um componente crítico da progressão tumoral, enaltecendo o papel do microambiente, que é, em grande parte “orquestrado” por células inflamatórias, como indispensável participante do processo neoplásico, promovendo a proliferação, sobrevivência e migração de células neoplásicas (Troppan *et al.*, 2014). Para diferentes tipos de tumor, bem como para o linfoma, certos parâmetros inflamatórios como a contagem de leucócitos, neutrófilos e linfócitos, têm sido associados a uma maior taxa de mortalidade (Cao *et al.*, 2012). Para além destes parâmetros, também o RNL tem sido identificado como um factor de prognóstico independente para o TS e PP de vários tipos de cancro, incluindo o carcinoma renal, cancro colorectal, sarcomas e tumores pancreáticos (Szkandera *et al.*, 2013a). Recentemente, o RNL tem sido apontado como um factor de prognóstico simples e acessível em pacientes LBDCG tratados com R-CHOP (Porrata *et al.*, 2010).

As células inflamatórias associadas ao tumor podem libertar fatores de sobrevivência e crescimento, promovendo a angiogenese e linfangiogenese, estimulando o dano no ADN e promovendo a evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro (De Visser *et al.*, 2006). Embora fosse expectável que a resposta inflamatória tenha uma acção tumoral supressiva, pacientes com cancro muitas vezes têm uma resposta inflamatória insuficiente (Finn *et al.*, 2012). Em vários tipos de tumores, como no cancro de mama, melanoma e linfoma, as células do sistema imunitário inato relacionam-se com aumento da angiogenese e mau prognóstico, o que é explicado pela supressão da resposta imunitária adaptativa antitumoral (Troppan *et al.*, 2014). Por outro lado, os linfócitos infiltrantes estão associados a um melhor prognóstico, como foi recentemente demonstrado em tumores pulmonares e neoplasias ováricas (Horne *et al.*, 2011). As células do sistema imunitário adaptativo, como os linfócitos B, CD4⁺ helper, linfócitos T e linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, modulam o desenvolvimento cancerígeno via lise tumoral mediada ou estabelecendo um estado pró-inflamatório no microambiente tumoral, revelando o papel paradoxal de leucócitos adaptativos e inatos como reguladores cruciais do desenvolvimento cancerígeno (Troppan *et al.*, 2014). O papel crítico dos linfócitos B em iniciar inflamação crónica já foi demonstrado por De Visser *et al.* (2006).

Nos últimos anos, a resposta inflamatória sistémica tem sido identificada como um importante “condutor” da progressão neoplásica em diferentes tipos de cancro (Proctor *et al.*, 2011a). No

geral, o RNL reflecte, supostamente, a resposta inflamatória sistêmica que acompanha doenças crônicas, mas também pode ser influenciado por vários fatores, incluindo infecções sistêmicas, aterosclerose, hipertensão, doença renal crônica e diabetes (Szkandera *et al.*, 2013b).

11.1. Linfócitos

A célula imunológica mais importante é o linfócito (Day *et al.*, 2008). Existem duas subpopulações principais de linfócitos, os T e os B. A maioria são linfócitos pequenos de 6-9µm e têm um núcleo redondo e grande com cromatina condensada e um citoplasma escasso com poucos organelos. Os pequenos linfócitos podem ser células T ou B e estas podem ser imunologicamente “virgens”, ou seja, que ainda não foram expostas a antígeno, ou podem ser células de memória, ou seja que já participaram numa resposta imune antígeno-específica, (Day *et al.*, 2008). Os linfócitos T ou B activos numa resposta imunitária, apresentam-se como grandes linfócitos ou linfoblastos de 12-15µm, com relativamente mais citoplasma e reduzida condensação de cromatina nuclear (Day *et al.*, 2008). Reconhece-se, também, uma população separada de grandes linfócitos com citoplasma granular (grandes linfócitos granulares ou células “natural killer” (NK). As células plasmáticas são um estadio final de diferenciação de linfócitos B, e são responsáveis pela síntese de Ig. Estas são células ovais de 8-18µm com núcleos redondos de posição excêntrica e condensação linear da cromatina. As células plasmáticas têm organelos citoplasmáticos abundantes para síntese de proteínas, por vezes visíveis como uma “zona de Golgi” perinuclear (Day *et al.*, 2008). Linfócitos T e B não podem ser distinguidos citologicamente, mas podem ter diferentes localizações anatómicas, função e expressão de moléculas de superfície (fenótipo). Os Linfócitos B e células Plasmáticas estão envolvidos na produção de Ig (imunidade humoral), enquanto as células T exercem funções regulatórias e citotóxicas (imunidade mediada por células) e as células NK são citotóxicas. Os linfócitos T são caracterizados pela expressão de TCR, e os linfócitos B têm imunoglobulina de membrana de superfície (surface membrane immunoglobulin (SmIg)). Um grande número de outras moléculas de superfície de linfócitos tem sido identificado, e com expressão restrita a células T ou B. Muitas dessas moléculas são definidas por uma “Cluster differentiation number”, por exemplo CD3 é expressado pelos linfócitos T e o CD79 pelos B (Day *et al.*, 2008).

11.1.1. Linfócitos T

As células T imaturas, originadas na medula óssea, são exportadas para o timo pela corrente sanguínea, onde são submetidas a uma sequência de eventos de maturação. A grande maioria

das células T que entra no timo não “passa o teste” de selecção positiva e negativa, e morre por apoptose (morte celular programada). As células T libertadas pelo timo são capazes de participar na produção de resposta imune contra antígenos “estranhos”, mas uma pequena porção das células T com TCRs com baixa afinidade para antígenos próprios (self) “escapam” à deleção clonal, e podem potencialmente mediar uma reacção auto-imune (Tizard *et al.*, 2013).

11.1.2. Linfócitos B

A maturação das células B ocorre maioritariamente na medula óssea. A maioria destas células morre por apoptose dentro da medula, e é fagocitada por macrófagos. O desenvolvimento das células B na medula óssea, provavelmente, envolve alguma forma de selecção pela interacção com células do estroma com deleção clonal de células autoreativas. Todas as células B imaturas expressam inicialmente IgM, mesmo que, eventualmente, venham a expressar outra Ig. As células B são libertadas para a periferia como linfócitos B virgens, que são caracterizados pela expressão concomitante de SmIgM e SmIgD (Tizard *et al.*, 2013).

11.2. Neutrófilos

Os neutrófilos são considerados parte do sistema imunitário inato, e são células chave em estadios iniciais de resposta inflamatória. São formados na medula óssea e libertados na circulação, onde circulam por um curto período de tempo (+/-10h) antes de entrarem nos tecidos. Aqui, sobrevivem apenas por alguns dias antes de sofrerem apoptose (Tizard *et al.*, 2013). Em resposta à “lesão de tecido” (tissue damage) ou na presença de agentes infecciosos os neutrófilos são rapidamente atraídos para o tecido afectado, onde efectuem fagocitose de partículas materiais. O processo de fagocitose pode ser facilitado pela interacção de partículas opsoninas (Ig e/ou complemento) com receptores de membrana do neutrófilo (Day *et al.*, 2008). As partículas fagocitadas estão contidas em compartimentos citoplasmáticos (fagossomas), que se fundem com azurofílico citoplasmático e outros grânulos específicos para formar um fagolisossoma. Dentro deste compartimento, o material fagocitado é exposto a uma variedade de enzimas degradativas (Day *et al.*, 2008). Grânulos específicos também se podem fundir com a membrana celular, resultando na libertação extracelular do seu conteúdo, provocando inflamação local no tecido envolvente. Intermediários do oxigénio reactivo (ROS), gerados pelo consumo de oxigénio durante a fagocitose, também podem danificar o material fagocitado, e ser libertados para os tecidos envolventes, contribuindo para a inflamação. Por fim, os neutrófilos podem libertar metabolitos do ácido araquidónico que podem aumentar ainda mais a inflamação (Day *et al.*, 2008).

12. Resposta imunitária anti-tumoral

12.1. Reposta imunitária inata e adaptativa

A observação por Rudolf Virchow em 1863 de que os leucócitos infiltram tumores foi a primeira indicação de que o sistema imunitário activamente marcava células tumorais para eliminação (Bitmansour *et al.*, 2012). Os leucócitos encontrados no microambiente tumoral incluem os que medeiam tanto a resposta imunitária inata como adaptativa. Os macrófagos presentes em tumores são referidos como macrófagos associados ao tumor (MAT). Embora os MAT entrem no microambiente tumoral para destruir células tumorais, estes podem ser reprogramados pelas células tumorais para inibir a função linfocitária pela libertação de IL-10 e ROS (Mantovani *et al.*, 2011). Linfócitos infiltrantes do tumor (LIT) da resposta imunitária adaptativa incluem tanto T helper CD4+, como T citotóxicos CD8+ (CTL). Muitas das células T infiltrantes são específicas para antigénios associados ao tumor (AAT). Embora os LIT se possam acumular no tumor, não parecem ser muito efectivas na eliminação de células neoplásicas. Pensa-se que isto aconteça, talvez porque as células tumorais expressam níveis baixos de AAT (Bitmansour, 2012). As células tumorais são manifestações malignas de células normais. O sistema imunitário é submetido a vários passos de “educação” para remover células autoreativas. Esta ação é estendida ao microambiente tumoral em que as células imunitárias infiltrantes toleram antigénios tumorais (Bitmansour, 2012). Assim, a resposta imunitária anti-tumoral é um processo de interacções complexas entre vários tipos de células.

12.2. A Hipotese da Imunoedição Tumoral

A complexa interação entre as células tumorais e imunitárias tem sido abordada pela hipótese de imunoediting tumoral, que enfatiza a dualidade das acções protetora e promotora do sistema imunitário do hospedeiro em tumores em desenvolvimento. Esta hipótese descreve as interacções entre as células tumorais e a resposta imunitária em 3 fases: eliminação, equilíbrio e escape (Schreiber, 2011). Durante a fase de eliminação, enquanto as células neoplásicas se formam, mecanismos de supressão como reparação de ADN e apoptose tentam controlar a rápida proliferação das células transformadas. As células tumorais sobreviventes, que expressam AAT e outros sinais de “perigo” associados ao tumor, activam a resposta imunitária inata e adaptativa. Muitas células transformadas são eliminadas com sucesso nesta fase, antes de se tornarem clinicamente aparentes (Bitmansour, 2012). Contudo, está postulado que um pequeno número de células tumorais, ou variantes do tumor original, como

resultado da selecção por pressão, escapam a esta eliminação e entram na fase de equilíbrio. Nesta fase, o sobre crescimento tumoral é prevenido pela resposta antitumoral, mas as células tumorais não são completamente eliminadas. Nesta fase, existem, também, numa espécie de “dormência”, que pode durar longos períodos de tempo sem qualquer manifestação clínica. Pensa-se que a imunoedição tumoral ocorra nesta fase de equilíbrio em que clones das células tumorais, que activam a actividade imunitária, são continuamente removidas. Esta constante vigilância imunitária impõe uma selecção de pressão em células tumorais geneticamente instáveis, que geram clones que não são reconhecidos pelo sistema imunitário. Estes clones entram na fase de “escape”, após terem adaptado vários mecanismos imuno-evasivos (Bitmansour, 2012). Conseguem mascarar as suas características que eram inicialmente reconhecidas pelo sistema imunitário. Para além disso, conseguem induzir apoptose em células imunitárias por contacto, e também geram um microambiente imunossupressivo, através da secreção de fatores solúveis inibitórios e recrutamento de células imunossupressivas que, por sua vez, inibem a resposta imunitária anti-tumoral (Bitmansour, 2012).

Assim, enquanto a resposta imunitária pode inicialmente controlar o crescimento tumoral, as células neoplásicas conseguem inverter o balanço para favorecer a sua expansão, manipulando as células imunitárias para infiltrar o microambiente tumoral (Bitmansour, 2012).

A transição que as células tumorais fazem da fase de equilíbrio para a de escape constitui um evento crítico no desenvolvimento de cancro. A resposta imunitária anti-tumoral pode, inicialmente, destruir as tumorais ou conduzi-las a um estado de “dormência”. Infelizmente, este parece ser temporário, e as células tumorais eventualmente relapsam ou voltam a ganhar potencial proliferativo. Por isso, a dormência tumoral representa um importante componente na investigação do cancro, já que engloba o encontro entre células tumorais que tentam proliferar e uma resposta imunitária antitumoral direccionada contra as mesmas (Bitmansour, 2012).

13. Avaliação do Rácio Neutrófilos/Linfócitos no Linfoma B Difuso de Células Grandes

13.1. Objetivos

Com a elaboração deste estudo retrospectivo pretendeu-se avaliar o valor prognóstico do rácio neutrófilos linfócitos (RNL) em cães diagnosticados com LBDCG e tratados com protocolo CHOP.

13.2. Materiais e Métodos

A amostra analisada neste estudo é constituída por 30 cães previamente diagnosticados com Linfoma B Difuso de Células Grandes de acordo com o esquema da OMS, após análise histopatológica dos linfonodos e tratamento com CHOP de 19 semanas.

Todos os cães foram acompanhados no Hospital Veterinário Berna desde Janeiro de 2010 a Março de 2016, vindo a ser submetidos a tratamento quimioterápico com CHOP.

Foram incluídos neste estudo cães com diagnóstico histopatológico de LBDCG que tenham realizado protocolo CHOP, tendo sido excluídos todos os animais que apresentassem doenças concomitantes (ex: doenças endócrinas, etc.), que não tivessem cumprido o protocolo CHOP e que já tivessem desenvolvido outras neoplasias no passado. Todos os animais estudados faleceram devido à neoplasia.

Quanto aos critérios de inclusão e de exclusão, foram incluídos neste estudo todos os cães com diagnóstico histopatológico de LBDCG que tenham realizado e concluído tratamento com protocolo CHOP. Foram excluídos deste trabalho todos os canídeos que apresentassem doenças concomitantes (ex: doenças endócrinas), que não tenham concluído tratamento com protocolo CHOP (excepto se por causa de morte devido à neoplasia) e que já tivessem desenvolvido outras neoplasias no passado. Todos os animais estudados faleceram devido ao curso da doença neoplásica.

A recolha de dados foi feita a partir da história clínica e análises laboratoriais dos animais, hemogramas, bioquímicas, estadiamentos e inscrita no sistema operativo Winvet® utilizado no referido Hospital.

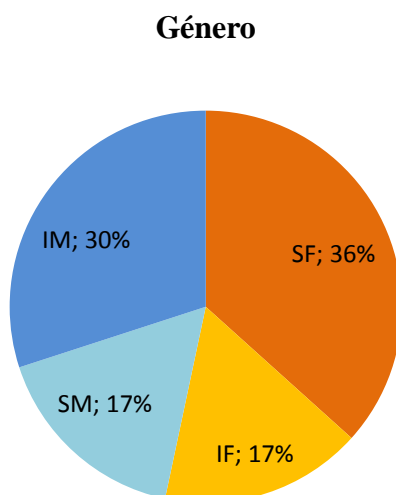
Para a população estudada foram registadas as seguintes características: género, idade, raça, diagnóstico histopatológico de LnH de acordo com a OMS e o seu estadiamento.

A análise estatística dos resultados obtidos foi executada com recurso aos programas RStudio e Microsoft® Excel (2013).

13.3. Resultados

13.3.1. Caracterização da amostra estudada

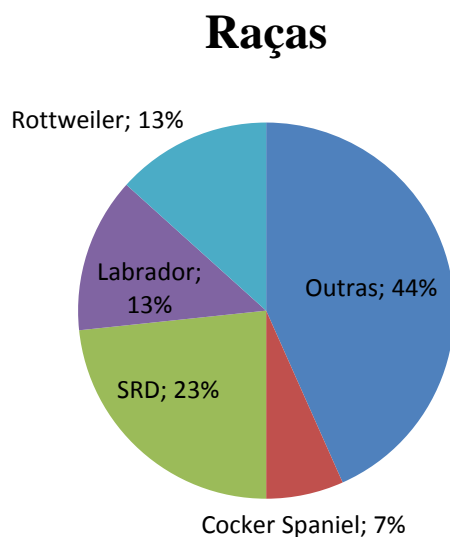
Gráfico 1 - Distribuição da amostra quanto ao género



Do conjunto de 30 cães inseridos no presente estudo, 14 eram machos (46,67%) e 16 eram fêmeas (53,33%). Das fêmeas, 11 eram esterilizadas (SF) (68,75%) e 5 inteiras (IF) (31,25%). Dos machos, 9 eram inteiros (IM) (64,29%) e 5 esterilizados (SM) (35,71%).

Quanto às raças representadas, 7 eram de raça indeterminada (23,33%), 4 de raça Rottweiler (13,33%), 4 de raça Retriever do Labrador ou cruzado de Labrador (13,33%), 2 Cocker Spaniel (6,67%) e 1 representante (3,33%) de cada uma das seguintes raças: American Staffordshire Terrier, Bassett Hound, Bull Terrier, Doberman, Golden Retriever, Dogue Alemão, Lhasa Apso, Pequinois, PittBull, Poodle, Shar pei, Serra da Estrela e West Highland White Terrier (total 43,33%). Numa classificação categórica, assumindo animais com *pedigree* e animais sem raça definida como únicas categorias, verificou-se uma predominância dos indivíduos com raça pura, representando estes 77% (23), contra 23% (7) sem raça definida da amostra.

Gráfico 2 - Distribuição da amostra quanto à raça



A média de idades é de 9,7 anos, com um intervalo de 4 a 17 anos.

Quanto à média de Neutrófilos, esta é de 9997,2/ μ l, com um intervalo de 2112 a 25917/ μ l. A média de Linfócitos é de 2383,3/ μ l, com um intervalo 305 a 22005/ μ l. Quanto à média do RNL, esta é de 7,552, com um intervalo de 0,488 a 23,544. A média de Tempo de Sobrevida (TS) é de 217,367 dias, com um intervalo de 32 a 705 dias. Quanto à média de Período de Progressão (PP), esta é de 107,933 dias, com um intervalo de 0 a 431 dias.

Como se observa no Gráfico 3, 77,6% dos linfomas (23/30) se apresentavam no estadio IV; destes, 60,87% (14/23) apresentavam-se no subestadio b e 39,13% (9/23) no subestadio a. Os restantes 23,3% (7/30) apresentavam-se no estadio III; destes, 57,14% (4/7) apresentavam-se no subestadio a e 42,86% (3/7) no subestadio b. Numa perspetiva geral, evidenciada na Gráfico 4, 10% dos animais apresentava estadio III e sub-estadio b, 13% estadio III e subestadio a, 30% estadio IV e sub-estadio a, e 47% apresentava estadio IV e sub-estadio b.

Gráfico 3 – Comparação do sub-estadio em função do estadio da OMS

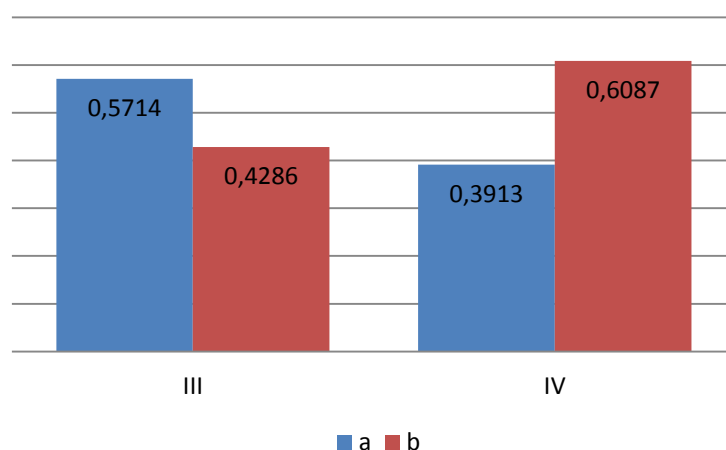
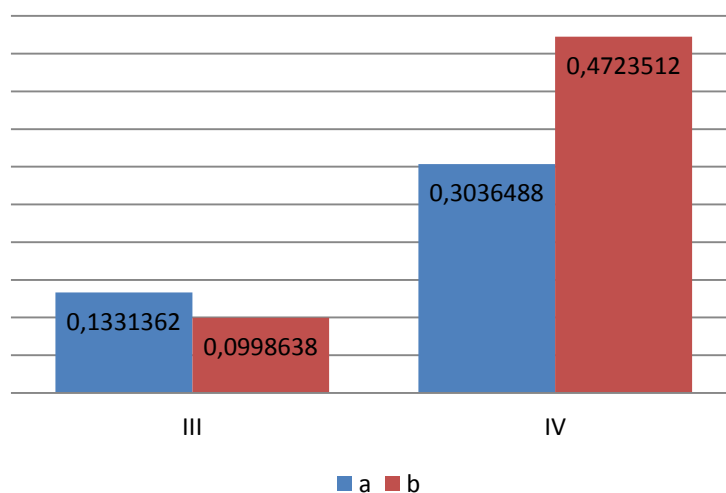


Gráfico 4 – Distribuição total da amostra de acordo com os vários estadios e subestadios da OMS

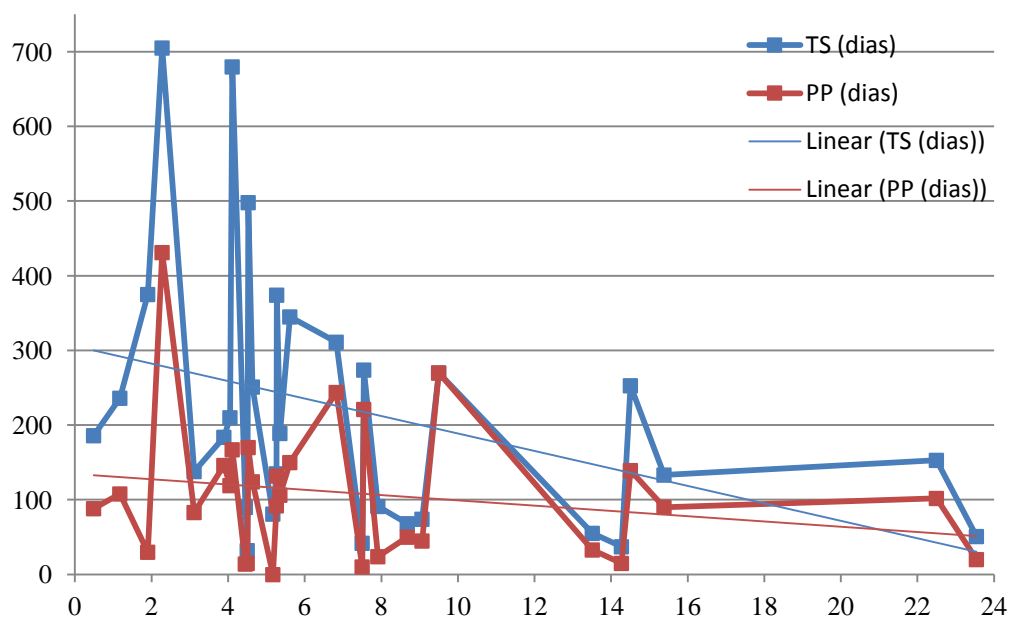


A análise de correlação entre as variáveis RNL e TS é de -0,382290319, com um valor de $p=0,03708$. Sendo a correlação negativa considerou-se existir tendência para se verificar diminuição do TS com o aumento do RNL.

A análise de correlação entre RNL e PP é de -0,215, com um valor de $p=0,254$. Sendo a correlação negativa considerou-se existir tendência para se verificar diminuição do PP com o aumento do RNL.

De acordo com a análise inicial dos dados, obteve-se um valor de “cut-off” de RNL= 3,1, superior ao qual o TS diminui significativamente.

Gráfico 5 - Correlação RNL-TS e RNL-PP



13.3.2. Determinação do Valor Cut-off de RNL

Tabela 6 – Relação entre RNL e a percentagem de animais com o TS

N	RNL	Tempo de Sobrevivência em dias										
		50	100	150	180	200	250	300	350	400	450	500
3	2	100%	100%	100%	100%	67%	33%	33%	33%	0%	0%	0%
4	3	100%	100%	100%	100%	75%	50%	50%	50%	25%	25%	25%
4	3,115	100%	100%	100%	100%	75%	50%	50%	50%	25%	25%	25%
5	3,2	100%	100%	80%	80%	60%	40%	40%	40%	20%	20%	20%
12	5	92%	83%	75%	75%	58%	42%	33%	33%	25%	25%	17%
17	6	94%	82%	71%	71%	53%	41%	35%	29%	18%	18%	12%
18	7	94%	83%	72%	72%	56%	44%	39%	28%	17%	17%	11%
21	8	90%	76%	67%	67%	52%	43%	33%	24%	14%	14%	10%
22	9	91%	73%	64%	64%	50%	41%	32%	23%	14%	14%	9%
24	10	92%	71%	63%	63%	50%	42%	29%	21%	13%	13%	8%
24	11	92%	71%	63%	63%	50%	42%	29%	21%	13%	13%	8%
24	12	92%	71%	63%	63%	50%	42%	29%	21%	13%	13%	8%
24	13	92%	71%	63%	63%	50%	42%	29%	21%	13%	13%	8%
25	14	92%	68%	60%	60%	48%	40%	28%	20%	12%	12%	8%
27	15	89%	67%	59%	59%	48%	41%	26%	19%	11%	11%	7%
28	16	89%	68%	57%	57%	46%	39%	25%	18%	11%	11%	7%
28	17	89%	68%	57%	57%	46%	39%	25%	18%	11%	11%	7%
28	18	89%	68%	57%	57%	46%	39%	25%	18%	11%	11%	7%
28	19	89%	68%	57%	57%	46%	39%	25%	18%	11%	11%	7%
28	20	89%	68%	57%	57%	46%	39%	25%	18%	11%	11%	7%
28	21	89%	68%	57%	57%	46%	39%	25%	18%	11%	11%	7%
28	22	89%	68%	57%	57%	46%	39%	25%	18%	11%	11%	7%
29	23	90%	69%	59%	55%	45%	38%	24%	17%	10%	10%	7%

Tempo de Sobrevivência em dias												
N	RNL	50	100	150	180	200	250	300	350	400	450	500
30	24	90%	67%	57%	53%	43%	37%	23%	17%	10%	10%	7%

Nesta tabela está representada a distribuição de TS dos animais estudados. A primeira coluna, “N”, corresponde à frequência relativa cumulativa dos animais consoante o valor de RNL representado na segunda coluna. Por exemplo: para $RNL \leq 2$ temos 3 animais, para $RNL \leq 3$ temos 4 animais, assim consecutivamente até estarem incluídos os 30 animais. As colunas 3 a 13 contêm informação relativamente à percentagem de animais que se encontravam vivos para o TS enunciado, relativamente ao RNL. Assim, para TS=50 e $RNL \leq 3$, 100% dos animais encontram-se vivos. Já para TS=50 e $RNL \leq 5$, tinham sobrevivido 92% e para TS=150 e $RNL \leq 8$, 67% dos animais tinham sobrevivido.

Assim, podemos observar que até $RNL \leq 3,115$, a percentagem de animais sobreviventes é = 100% até TS= 180 dias (6 meses). Para o valor imediatamente abaixo, $RNL \leq 3,2$ a percentagem de animais vivos para TS= 180 cai para 80%, diminuindo este valor com o aumento do RNL. De acordo com esta avaliação podemos considerar o valor cut-off de RNL 3,115, que arredondado é igual a 3,1.

13.4. Discussão

O linfoma é uma das neoplasias de maior incidência no cão, representando aproximadamente 7% de todas as neoplasias nesta espécie (Maurizio Martelli *et al.*, 2013). O tipo histológico mais comum em medicina veterinária, a par com a medicina humana, é o Linfoma B Difuso de Células Grandes (LBDCG), que constitui sensivelmente 50% de todos os linfomas no cão e 40% no Homem (Valli *et al.*, 2013).

As características epidemiológicas analisadas neste trabalho vão ao encontro do que já fora referido em estudos anteriores quanto ao linfoma no cão. Relativamente à predisposição de género, os resultados obtidos vão ao encontro do reportado por Maurizio Martelli, 2013.

Segundo este autor, o desenvolvimento de linfoma não apresenta associação com o género do animal. No entanto, na população da amostra, na qual se verifica uma proporção equilibrada entre machos e fêmeas, observa-se sobre-expressão de fêmeas esterilizadas e machos inteiros, relativamente a fêmeas inteiras e machos castrados. Tal facto pode estar relacionado com o efeito protetor das hormonas sexuais femininas já anteriormente descrito (Villamil *et al.*, 2009), ou ainda, talvez, com um preconceito por parte dos cuidadores quanto à castração dos

machos devido às vantagens que esta intervenção proporciona, relativamente à esperança média de vida dos seus animais (Promislow, 2013).

No que diz respeito à raça, verifica-se que a maioria dos indivíduos da amostra é de raça pura. Esta prevalência de cães com *pedigree* corresponde, também, ao que já está descrito na literatura. Poder-se-á especular que a incidência verificada numa amostra maioritariamente constituída por indivíduos de raça pura estará relacionada com a predisposição de determinadas raças para o desenvolvimento de linfoma. De facto, a raça mais representada é o Rottweiler que é uma das raças predispostas para o desenvolvimento de linfoma, bem como de outras neoplasias (Dobson, J. M., 2013). Tal situação pode, também, estar correlacionada com a maior disponibilidade por parte dos proprietários destes animais para custear terapêuticas adequadas, independentemente dos custos. Não constam da nossa amostra outras raças predispostas como o Boxer, o Bullmastif ou o Bulldog. Isto pode dever-se à questão da popularidade de determinadas raças em Portugal. Por exemplo, os Bullmastif são uma raça bastante rara no nosso país e, embora os Bulldogs sejam hoje em dia muito numerosos, a sua popularidade cresceu maioritariamente nos últimos 2 anos, não tendo a grande maioria dos animais ainda atingido a idade de desenvolvimento de linfoma. Relativamente ao Boxer, embora esta seja uma raça popular em Portugal, a sua baixa representatividade neste trabalho pode estar relacionada com o tipo de linfoma seleccionado na amostra (LBDCG), uma vez que está descrita a susceptibilidade desta raça para o desenvolvimento de linfoma de fenótipo T (Dobson, J. M., 2013; Fan, 2003).

Quanto à progressão da doença, 77,6% dos indivíduos da amostra (23/30) apresentou-se no estadio IV e os restantes 23,4% no estadio III (7/30), no momento do diagnóstico. No que diz respeito ao subestadio a prevalência de animais sintomáticos é superior no estadio IV, sendo esta de 60,87% (14/23) quando comparados com os animais sintomáticos no estadio III, sendo estes 42,86% (3/7). Estes valores correspondem então à bibliografia existente, que refere que muitos dos animais não exibem sintomatologia até a doença estar já muito avançada. Assim se observa nesta amostra, em que dos animais em estadio III a maioria é assintomática, apresentando subestadio **a**, enquanto a maioria dos animais de estadio IV apresenta sintomatologia, ou seja, subestadio **b**. Deste modo conclui-se que o linfoma é uma doença de diagnóstico e tratamento tardios em medicina veterinária. Esta situação pode ser um fator determinante para a efetividade do tratamento e sobrevivência dos doentes. (Johnston, Thamm, & Legutki, 2014).

Relativamente à idade, a maioria dos doentes apresentava idade entre os 6 e os 9 anos (15/30; 50%) o que, mais uma vez, está de acordo com a literatura existente, que refere ser esta a

idade de maior incidência da doença (Argyle, 2008; Vail & Young, 2013), à semelhança do que se passa com várias neoplasias, já que são na sua maioria doenças de animais geriátricos. Como referido, o principal objectivo deste estudo foi o de avaliar o RNL antes da quimioterapia relativamente ao TS em cães com LBDCG e, assim, avaliar o seu potencial como prognóstico nesta mesma população.

As características clínicas e a patologia molecular são dois dos fatores mais importantes a considerar na selecção de estratégias de tratamento e na previsão da evolução no LBDCG. Vários estudos têm estabelecido a relação entre o sistema imunitário e o desenvolvimento de linfoma com base nos valores de neutrófilos e linfócitos obtidos antes do tratamento. O papel prognóstico do RNL tem sido estudado para vários tipos de neoplasias, como é o caso do linfoma (Wang *et al.*, 2016). Keam *et. al* mostrou em pacientes humanos com LBDCG, que o RNL elevado no momento do diagnóstico pode ser um indicador de mau prognóstico após quimioterapia com R-CHOP. O RNL constitui um indicador de prognóstico em várias neoplasias, já que se pensa que este refletirá a atividade pro-tumoral dos neutrófilos e a reduzida resposta imunitária anti-tumoral por parte dos linfócitos (Kim *et al.* 2014). Por esta razão, estuda-se o RNL com o objectivo de comparar a resposta inflamatória originada pelo tumor (neutrófilos), com a imunidade do hospedeiro (linfócitos) (Porrata, 2010).

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que existe uma correlação de valor: -0,38 entre RNL e TS, o que é estatisticamente relevante (valor de $p = 0,037$). Sendo a correlação negativa e o valor de p estatisticamente relevante, entende-se assim que quanto maior é o valor de RNL, menor é o TS e por isso se considera ter pior prognóstico. Observa-se ainda que, com o aumento do RNL, o prognóstico piora particularmente em valores superiores ao *cut-off* de 3,1, visto que 100% dos animais com $RNL \leq 3,1$ sobrevivem até aos 180 dias, e para valores de RNL progressivamente superiores a 3,1, a percentagem de animais sobreviventes vai diminuindo de forma proporcional.

Como é possível observar pelo Gráfico 5, existe também uma relação directa entre o TS e o PP. Entende-se que isto aconteça já que o PP corresponde ao período de tempo que decorre entre a data de diagnóstico e a data de recidiva (ou da saída da remissão), após a qual o TS é, em regra, reduzido.

É possível concluir que existe uma tendência para o PP diminuir com o aumento do RNL. Esta tendência é observada pelo valor da análise de Correlação entre PP e RNL de -0,215, bem como pela análise do Gráfico 5, em se observa um declive descendente da linha de regressão linear que representa o PP. No entanto, não sendo o valor de p estatisticamente relevante (valor de $p = 0,254$), não podemos considerar que exista uma correlação no

verdadeiro sentido da palavra, mas sim uma tendência. Do mesmo modo, e confirmando este mesmo resultado, um estudo realizado em pacientes humanos com LBDCG também não encontrou correlação estatisticamente relevante entre o RNL e o PP (Wang *et. al*, 2016).

Assim, para a amostra analisada neste estudo conclui-se que o RNL tem valor prognóstico em cães com LBDCG. Quanto ao valor *cut-off* obtido de $RNL \geq 3,1$, este também é semelhante ao encontrado em estudos recentes de medicina humana em que o valor identificado é de 3 (Keam *et. al* 2015), superior ao qual o TS diminui significativamente.

Os estudos efectuados em medicina veterinária, até à data, não demonstraram relevância estatística entre RNL e TS, possivelmente por não incidirem sobre um histotipo específico de linfoma (Mutz, 2013). Tanto quanto é do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia a associação prognóstica entre o RNL determinado antes da quimioterapia e o TS em cães com LBDCG, tratados com protocolo CHOP. Pela análise desta amostra, a confirmar com estudos com mais casuística, conclui-se que há motivos para considerar que o RNL poderá ter um valor prognóstico relevante em cães com LBDCG tratados com CHOP.

Como já foi referido, os resultados encontrados neste estudo vão ao encontro do que está descrito em estudos do mesmo género realizados em pacientes com LBDCG em Medicina Humana tratados com R-CHOP, ou seja, foi demonstrado existir uma correlação negativa entre o RNL e o TS, sobretudo acima do valor *cutoff* (Porrata, 2010; Kim *et. al*, 2014). Um outro estudo demonstra que pacientes com $RNL \geq 2,81$ exibiam uma alta prevalência de expressão de LDH, estadio avançado e pior TS (Wang, *et.al*, 2016).

O RNL tem sido sugerido como um factor de prognóstico em vários tipos de tumor. Este é um marcador relacionado com a inflamação sistémica, que tem por sua vez sido apontada como um dos “hallmarks” do cancro (Sung *et al.*, 2017), e estudos que avaliam o perfil e sequenciação da expressão génica indicam que a resposta inflamatória do hospedeiro e o microambiente tumoral são características importantes no LBDCG (Wang, *et.al*, 2016). Contudo, o mecanismo exacto através do qual o RNL afecta o prognóstico em pacientes com LBDCG ainda é desconhecido (Wang, 2016). Sabe-se que este marcador constitui um indicador de inflamação que relaciona a contagem de neutrófilos com a contagem de linfócitos. Assim, um RNL elevado reflete uma contagem de neutrófilos relativamente elevada e depleção de linfócitos (Sung *et al.*, 2017). Os níveis elevados de neutrófilos estão associados a pior prognóstico em pacientes com diferentes neoplasias. Estes secretam fator de crescimento endotelial vascular e várias proteases, favorecendo um microambiente promotor de tumor, que facilita a invasão tumoral e a metastização (Wang, 2016). Também as interações entre células tumorais e células inflamatórias são cruciais para a sobrevivência e

proliferação da neoplasia. Como marcador de inflamação, o RNL está relacionado com fatores imunitários como os macrófagos associados ao tumor (MAT) no microambiente tumoral, os linfócitos e as células NK no tecido tumoral (Wang, 2016). Assim, a relação entre um RNL elevado com um pior prognóstico pode também estar associada ao microambiente tumoral. Os componentes celulares do microambiente tumoral englobam células linfóides, mastócitos, macrófagos, células NK, células dendríticas e outras células do sistema imunitário inato, sendo que vários estudos têm mostrado que os MAT e os monócitos podem inibir a imunidade antitumoral do hospedeiro, e afectar, assim, o prognóstico do LBDCG (Wang, *et.al*, 2016). Devido à insuficiente imunidade antitumoral, há, então, diminuição dos valores de linfócitos, que têm ações antitumorais importantes, promovendo o relapso tumoral e a metastização (Wang, *et.al*, 2016). Os linfócitos por seu lado, desempenham um papel na imunidade adaptativa contra as células neoplásicas, e a depleção de linfócitos reflete uma imunidade anti-tumoral enfraquecida. A resposta inflamatória sistémica persistente induz, assim, a tumorigénese, por promover a angiogénese, a inibição da apoptose e os danos no ADN (Sung *et al.*, 2017).

Vários estudos sobre a importância do RNL em LBDCG têm demonstrado resultados semelhantes. Porrata et al., indica que o RNL é um marcador económico e fácil de utilizar para avaliar o prognóstico em pacientes com LBDCG tratados com R-CHOP (Wang, *et.al*, 2016).

Resumindo, o RNL é um parâmetro clínico de fácil aplicação e baixo custo, que pode vir a desempenhar um papel importante na definição do prognóstico no LBDCG (Wang, *et.al*, 2016).

14. Conclusão

O linfoma no cão é uma neoplasia hematopoiética complexa com diferentes apresentações e vários histotipos, do qual o mais frequente é o LBDCG. As características epidemiológicas, discutidas no presente trabalho, são consistentes com os resultados de estudos anteriores, no que diz respeito à média de idades aquando do diagnóstico de linfoma (tendencialmente animais idosos) e, também, no que diz respeito às raças mais afectadas (como o Retriever do Labrador e o Rottweiler). Como também é referido, para esta amostra, o LBDCG revelou-se uma doença de diagnóstico tardio, não exibindo os animais sintomatologia até um estadio avançado (estadio IV). Foram, também, registadas mais fêmeas esterilizadas e machos inteiros afetados, o que pode sugerir a ação protetora das hormonas femininas para o desenvolvimento de linfoma no cão. (Villamin, 2009; Vail *et. al*, 2013).

O principal objectivo deste estudo era o de avaliar a correlação entre o RNL antes da quimioterapia, o TS e o PP na presente amostra de 30 cães com LBDCG tratados com CHOP.

Este estudo apresenta limitações pelo seu carácter retrospectivo e pela amostra reduzida. Ainda assim, foi possível concluir que, para esta amostra de cães com LBDCG tratados com CHOP, o RNL determinado antes da quimioterapia foi um indicador de prognóstico significativo e de fácil aplicação. Pela análise estatística, demonstrou-se que existe uma Correlação de -0,382 entre o RNL e o TS (valor de $p=0,037$). Foram, também, encontrados resultados semelhantes para o RNL antes da quimioterapia, em pacientes humanos com LBDCG tratados com R-CHOP. Pela análise da Tabela 6, foi ainda possível definir um valor *cutoff* RNL de 3,1, igual ou superior ao qual o TS e PP dos doentes encurtam significativamente, concluindo-se, por isso, que este é um indicador de mau prognóstico. Este resultado vai ao encontro do que já foi observado em pacientes humanos com LBDCG, para os quais está também provado que o TS diminui com o aumento do RNL, especialmente acima do valor *cutoff* de $RNL \geq 3$ (Keam *et. al*, 2015). No entanto, embora se observe uma tendência para diminuição do PP com o aumento do RNL, observada pelo valor da correlação de -0,215, esta não apresenta relevância estatística (valor de $p=0,254$). Também em medicina humana não foi possível encontrar uma correlação estatisticamente significativa entre o RNL e o PP (Wang *et. al*, 2016).

Tanto quanto se conhece, este é, pois, o primeiro estudo realizado em cães com LBDCG tratados com CHOP, que revela o RNL determinado antes da quimioterapia como indicador de prognóstico. Estudos anteriores que procuraram avaliar o papel prognóstico do RNL quanto ao TS e PP na espécie canina não obtiveram resultados estatisticamente relevantes. No

entender da autora, isso aconteceu pelo fato do estudo não incidir sobre um histotipo específico de linfoma (como o LBDCG), tendo sido avaliados indiscriminadamente todos os cães com linfoma, independentemente do seu histotipo.

Dada a natureza retrospectiva e o número reduzido da amostra seria importante conduzir outros estudos mais abrangentes e prospectivos, de modo a consolidar os resultados obtidos, quanto ao papel do RNL como indicador de prognóstico em cães com LBDCG, bem como identificar em que outros parâmetros este se possa reflectir e melhor explicar o porquê da sua interferência.

15. Bibliografia

- Alizadeh, A., Eisen, M., Davis, R., Ma, C., Lossos, I., Rosenwald, A., *et al.* (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403(6769):503–11
- Aresu, L., Martini, V., Rossi, F., Vignoli, M., Sampaolo, M., Aricó, A., Laganga, P., Pierini, A., Frayssinet, P., Mantovani, R., Marconato, L. (2013). Canine indolent and aggressive lymphoma: clinical spectrum with histologic correlation. *John Wiley & Sons Ltd*
- Aresu, L., Aricò, A., Ferraresso, S., Martini, V., Comazzi, S., Riondato, F., Giantin, M., Dacasto, M., Guadagnin, E., Frayssinet, P., Rouquet, N., Drigo, M., Marconato, L. (2014). Minimal residual disease detection by flow cytometry and PARR in lymph node, peripheral blood and bone marrow, following treatment of dogs with diffuse large B-cell lymphoma. *The Veterinary Journal, Elsevier Ltd*
- Aresu, L. (2016). Canine lymphoma, more than a morphological diagnosis: what we have learned about diffuse large B-cell lymphoma. *Front. Vet. Sci.* 3:77
- Argyle, D. (2008). What is new in canine and feline lymphoma. *In: Proceedings of the 33rd world small animal veterinary congress*, Dublin
- Aricò A., Ferraresso S., Bresolin S., Marconato L., Comazzi S. (2014). Array-Based Comparative Genomic Hybridization Analysis Reveals Chromosomal Copy Number Aberrations Associated with Clinical Outcome in Canine Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *PLoS ONE* 9(11): e111817
- Ayala, A., Herdon, C., Lehman, D. (1996). Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency and the nature of the mediators. *Blood* 87 , 4261– 4275
- Balkwill, F. & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to virchow? *Lancet* 357, 539 - 545
- Baskin, G.R, Couto, C.G., Wittum, T.E. (2000). Factors influencing first remission and survival in 145 dogs with lymphoma: A retrospective study. *J Am Anim Hosp Assoc* 36:404–409
- Bergman, P.J. (2012). Paraneoplastic hypercalcemia. *Top Companion Anim Med*, 27(4), 156-158
- Bitmansour, A. (2012). Examining the role of regulatory lymphocytes in a mouse model of BCL1 tumor. The University of Texas, Southwestern Medical Center at Dallas, Texas
- Blackwood, L., Sullivan, M., Lawson, H. (1997). Radiographic abnormalities in canine multicentric lymphoma: a review of 84 cases. *J Small Anim Pract*, 38(2), 62-69
- Blackwood, L., German, A.J., Stell, A.J., O'Neill, T. (2004). Multicentric lymphoma in a dog after cyclosporine therapy. *J Small Anim Pract*, 45(5), 259-262
- Bloom, F. & Meyer, L. (1945). Malignant Lymphoma (So-Called Leukemia) in Dogs. *Am J Pathol* 21(4), 683-715
- Bouchard, H. (2000). Epitheliotropic lymphoma in a dog. *Can Vet J*, 41(8), 628-630
- Bridgeford, E., Marini, P., Feng, Y., Parry, N., Rickman, B. & Fox, J. (2008). Gastric *Helicobacter* species as a cause of feline gastric lymphoma: A viable hypothesis. *Vet Immunol Immunopathol* 123(1-2): 106-113
- Bruner, J.D. & Hoover, J.P. (2007). B-cell lymphoma in a dog with ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*) and systemic histoplasmosis (*Histoplasma capsulatum*). *Can Vet J*, 48(3), 292-295

- Burton, J.H., Garrett-Mayer, E., Thamm, D.H. (2013). Evaluation of a 15-week CHOP protocol for the treatment of canine multicentric lymphoma. *Vet Comp Oncol*, 11(4), 306-315
- Caniatti, M., Roccabianca, P., Scanziani, E., Paltrinieri, S., Moore, P.F. (1996). Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Vet Pathol*, 33(2), 204-212
- Cao, Y., Shi, Y., Chen, J., Tan, Y., Cai, Y., Luo, H., Qiu, M., Cai, X., Jin, Y., Sun, Y., Jiang, W. (2012). Serum C- reactive protein as an important prognostic variable in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Tumour Biol* 33(4): 1039–1044
- Carioto, L., Kruth, S., Betts, D., King, W. (2001). Telomerase activity in clinically normal dogs and dogs with malignant lymphoma. *Am J Vet Res*, 62(9), 1442-1446
- Carter, R., Kruth, S., Valli, V., Dube, I. (1990). Long-term culture of canine marrow: cytogenetic evaluation of purging of lymphoma and leukemia. *Exp Hematol*, 18(9), 995-1001.
- Cesari, A., Bettini, G., Vezzali, E. (2009). Feline Intestinal T-Cell Lymphoma: Assessment of Morphologic and Kinetic Features in 30 Cases. *J Vet Diagn Invest* 21: 277-279.
- Chase, D., McLauchlan, G., Eckersall, P. D., *et al.* (2012) Acute phase protein levels in dogs with mast cell tumours and sarcomas. *Veterinary Record* 170, 648 – 652
- Cho, H., Hur, H. W., Kim, S. W., *et al.* (2009) Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment. 2009. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 58, 15 - 23
- Chun, R. (2009). Lymphoma: which chemotherapy protocol and why? *Top Companion Anim Med*, 24(3), 157-62.
- Cienava, E., Barnhart K., Brown, R. (2004). Morphologic, immunohistochemical, and molecular characterization of hepatosplenic T-cell lymphoma in a dog. *Vet Clin Pathol* 33:105–110.
- Cohen, M., De Matteo, E., Narbaitz, M., Carreno, F., Preciado, M., Chabay, P. (2013). Epstein-Barr virus presence in pediatric diffuse large B-cell lymphoma reveals a particular association and latency patterns: analysis of viral role in tumor microenvironment. *Int J Cancer*, 132(7), 1572-1580. doi: 10.1002/ijc.27845
- Couto, C. (2009). Lymphoma in the cat and dog. In: Nelson, R.W. & Couto C.G. (Eds.), *Small animal internal medicine*. (4^a Ed., pp.1174-1186), St. Louis: Mosby Elsevier
- Coyle, K., & Steinberg, H. (2004). Characterization of lymphocytes in canine gastrointestinal lymphoma. *Vet Pathol*, 41(2), 141-146
- Dallman, M. & Saunders, G. (1986). Primary spinal cord lymphosarcoma in ten dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 189(10), 1348-1349
- Day, M., (2008). *Clinical Immunology of the Dog and Cat* (2^a Ed., capítulo 1 e 13) Manson Publishing Ltd
- De Visser, K., Eichten, A., Coussens, L. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6(1): 24–37
- Devitt, J., Maranon, D., Ehrhart, E., Bachand, A., Lana, S., LaRue, S. (2009). Correlations between numerical chromosomal aberrations in the tumor and peripheral blood in canine lymphoma. *Cytogenet Genome Res*, 124(1), 12-18
- Dhaliwal, R., Kitchell, B., Ehrhart, E., Valli, V., Dervisis, N. (2013). Clinicopathologic significance of histologic grade, ppg, and p53 expression in canine lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc*, 49(3), 175-184

- Dobson, J., Blackwood, L., McInnes, E., Bostock, D., Nicholls, P., Hoather, T. (2001). Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J Small Anim Pract*, 42(8), 377-384
- Duncan, A., Marr, H., Birkenheuer, A., Maggi, R., Williams, L., Correa, M. (2008). Bartonella DNA in the blood and lymph nodes of Golden Retrievers with lymphoma and in healthy controls. *J Vet Intern Med*, 22(1), 89-95
- Durham, A., Pillitteri, C., San Myint, M., Valli, V. (2012). Two Hundred Three Cases of Equine Lymphoma Classified According to the World Health Organization (WHO) Classification Criteria. *Vet Pathol* 50(1): 86-93
- Elliott, J., Cripps, P., Blackwood, L. (2013). Thymidine kinase assay in canine lymphoma. *Vet Comp Oncol*, 11(1), 1-13
- Ettinger, S. (2003). Principles of treatment for canine lymphoma. *Clin Tech Small Anim Pract*, 18(2), 92-97
- Fan, T. (2003). Lymphoma Updates. *Vet Clin Small Anim* 33: 455-471.
- Ferraresso, S., Bresolin, S., Aricò, A., Comazzi, S., Gelain, M. (2014). Epigenetic Silencing of TFPI-2 in Canine Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *PLoS ONE* 9(4): e92707
- Finn, O. (2012). Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol* (Suppl 8):viii6–viii9
- Flory A., Rassnick K., Erb H. (2011). Evaluation of factors associated with second remission in dogs with lymphoma undergoing retreatment with a cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone chemotherapy protocol: 95 cases (2000-2007). *J Am Vet Med Assoc* 238:501–506
- Foglia Manzillo, V., Pagano, A., Guglielmino, R., Gradoni, L., Restucci, B., Oliva, G. (2008). Extranodal gammadelta-T-cell lymphoma in a dog with leishmaniasis. *Vet ClinPathol*, 37(3), 298-301
- Fontaine, J., Bovens, C., Bettenay, S. Mueller, R.S. (2009). Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review. *Vet Comp Oncol*, 7(1), 1-14
- Foster, A., Sturgess, C., Gould, D., Iwasaki, T., Day, M. (2000). Pemphigus foliaceus in association with systemic lupus erythematosus and subsequent lymphoma in a cocker spaniel. *J Small Anim Pract*, 41(6), 266-270
- Fournel-Fleury, C., Ponce, F., Felman, P., Blavier, A., Bonnefont, C., Chabanne, L., et al. (2002). Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological and clinical study of 46 cases. *Vet Pathol*, 39(1), 92-109
- Fry, M., Vernau, W., Pesavento, P., Brömel, C., Moore, P. (2003). Hepatosplenic lymphoma in a dog. *Vet Pathol*, 40(5), 556-562
- Galindo, L., Garcia, F., Hanau, C., Lessin, S., Jhala, N., Bigler, R., Vonderheid, E. (2000). Fine-needle aspiration biopsy in the evaluation of lymphadenopathy associated with cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides/Sezary syndrome). *Am J Clin Pathol*, 113(6), 865-871
- Garabrant, D., Philbert, M. (2002). Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology, *Crit Rev Toxicol* 32:233–257
- Garrett, L., Thamm, D., Chun, R., Dudley, R., Vail, D. (2002). Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med*, 16(6), 704-709
- Gavazza, A., Presciuttini, S., Barale, R., Lubas, G., Gugliucci, B. (2001). Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *J Vet Intern Med*, 15(3), 190-195
- Gibson, D., Aubert, I., Woods, J., Abrams-Ogg, A., Kruth, S., Wood, R. (2004). Flow cytometric immunophenotype of canine lymph node aspirates. *J Vet Intern Med*, 18(5), 710-717

- Higginbotham, C. (2010). *Cancer Management in Small Animal Practice* (1^a Ed.). 3251 Riverport Lane Maryland Heights, Missouri 63043: Saunders Elsevier
- Horne, Z., Jack, R., Gray, Z., Siegfried, J., Wilson, D., Yousem, S., Nason, K., Landreneau, R., Luketich, J., Schuchert, M. (2011). Increased levels of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with improved recurrence-free survival in stage 1A non-small-cell lung cancer. *J Surg Res* 171(1): 1–5
- Hotchkiss, R., Swanson, P., Freeman, B. (1999). Apoptotic cell death in patients with sepsis shock and multiple organ dysfunction. *Critical Care Medicine* 27, 1230–1251
- Huang, S., Kozak, P., Kim, J., Habineza-Ndikuyeze, G., Meade, C., Gaurnier-Hausser, A., Mason, N. (2012). Evidence of an oncogenic gammaherpesvirus in domestic dogs. *Virology*, 427(2), 107–117
- Idowu, O., Ding, Q., Taktak, A. (2012). Clinical implication of pretreatment neutrophil to lymphocyte ratio in soft tissue sarcoma. *Biomarkers* 17, 539–544
- Impellizzeri J., Howell K., McKeever K. (2006). The role of rituximab in the treatment of canine lymphoma: an ex vivo evaluation, *Vet J* 171:556–558
- Ito D., Endicott M., Jubala C. (2011). A tumor-related lymphoid progenitor population supports hierarchical tumor organization in canine B-cell lymphoma. *J Vet Intern Med* 25:890–896
- Jacobs, R., Messick, J., Valli, V. (2002). Tumors of the skin and hemolymphatic system, Meuten, D. (Eds.) In: Tumors in domestic animals. (4^a Ed.), Iowa: Iowa State Press
- Jagadeesh, D., Woda, B., Draper, J., Evens, A. (2012). Post transplant lymphoproliferative disorders: risk, classification, and therapeutic recommendations. *Curr Treat Options Oncol*, 13(1), 122–6
- Johnston, S., Thamm, D., Legutki, J. (2014). The immunosignature of canine lymphoma: characterization and diagnostic application. *BMC Cancer*, 14, 657
- Jubala, C., Wojcieszyn, J., Valli, V., Getzy, D., Fosmire, S., Coffey, D., Modiano, J. (2005). CD20 expression in normal canine B cells and in canine non-Hodgkin lymphoma. *Vet Pathol*, 42(4), 468–476
- Kaneene, J. & Miller, R. (1999). Re-analysis of 2,4-D use and the occurrence of canine malignant lymphoma. *Vet Hum Toxicol*, 41(3):164–70
- Keam, B., Ha, H., Kim, T. (2015). Neutrophil to lymphocyte ratio improves prognostic prediction of International Prognostic Index for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. *Leuk Lymphoma*, 56:2032–2038
- Kemal, Y., Yucel, I., Ekiz, K. (2014). Elevated serum neutrophil to lymphocyte and platelet to lymphocyte ratios could be useful in lung cancer diagnosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15, 2651 – 2654
- Kim, H., Han, K., Chung, H. (2010). Neutrophil/lymphocyte ratio for preoperative diagnosis of uterine sarcomas: a case-matched comparison. *The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 36, 691–698
- Kim, I., You, S., Kim, Y. (2014). Neutrophil-lymphocyte ratio predicts pathologic tumor response and survival after preoperative chemoradiation for rectal cancer. *BMC Surgery* 14, 94
- Larue, S., Fox, M., Ogilvie, G. (1999). Tumour cell kinetics as predictors of response in canine lymphoma treated with chemotherapy alone or combined with whole body hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 15:475–486
- Li, L., Pongtornpipat, P., Tiutan, T., Kendrick, S., Park, S., Persky, D. (2015). Synergistic induction of apoptosis in high-risk DLBCL by BCL2 inhibition with ABT-199 combined with pharmacologic loss of MCL1. *Leukemia* 17, 1702–1712

- Li, Y., Huang F., Cheng H. (2014). Intestine-derived *Clostridium leptum* induces murine tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in vitro. *Hum Immunol.* 75:1232-1238
- Lori, J., Stein, T., Thamm, D. (2010). Doxorubicin and cyclophosphamide for the treatment of canine lymphoma: a randomized, placebo-controlled study. *Vet Comp Oncol*, 8(3), 188-195
- Lu, H., Ouyang, W., Huang, C. (2006). Inflammation a key event in cancer development. *Molecular Cancer Research* 4, 221 – 233
- Lukes, R. & Collins, R. (1974). Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 34(4): 1488-1503
- Macfarlane, L., Morris, J., Pratschke, K., Mellor, D., Scase, T., Macfarlanm, M., Mclauchlan, G. (2015). Diagnostic value of neutrophil–lymphocyte and albumin globulin ratios in canine soft tissue sarcoma. Small Animal Hospital, School of Veterinary Medicine, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, *Journal of Small Animal Practice*, Vol 57, March 2016. © 2015 British Small Animal Veterinary Association
- Keller, E., MacEwen, E., Rosenthal, R., Helfand, S., Fox, L.E. (1993). Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. *J Vet Intern Med*, 7(5), 289-295
- Mahidhara, R. & Billiar, T. (2000). Apoptosis in sepsis. *Critical Care Medicine* 28, 105-113
- Mantovani, A., G. Germano, F. Marchesi, M. Locatelli, and S. K. Biswas. (2011). Cancer-promoting tumor-associated macrophages: New vistas and open questions. *Eur. J. Immunol.* 41: 2522-2525
- Marconato, L., Leo, C., Girelli, R., Salvi, S., Abramo, F., Bettini, G., Zini, E. (2009). Association between waste management and cancer in companion animals. *J Vet Intern Med*, 23(3), 564-569
- Marconato, L. (2011). The staging and treatment of multicentric high-grade lymphoma in dogs: a review of recent developments and future prospects. *Vet J*, 188(1), 34-38
- Marconato, L., Martini, V., Aresu, L., Sampaolo, M., Valentini, F., Rinaldi, V., & Comazzi, S. (2013). Assessment of bone marrow infiltration diagnosed by flow cytometry in canine large B cell lymphoma: prognostic significance and proposal of a cut-off value. *Vet J*, 197(3), 776-781. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.05.003
- Marconato, L., Frayssinet, P., Rouquet, N., Comazzi, S., Leone, V., Laganga, P., Rossi, F., Vignoli, M., Pezzoli, L., Aresu, L. (2014). Randomized, placebo-controlled, double-blinded chemoimmunotherapy clinical trial in a pet dog model of diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2014 Feb 1;20(3):668-77. Epub 2013 Dec 3
- Marconato, L., Martini, V., Stefanello, D., Moretti, P., Ferrari, R., Comazzi, S., Laganga, P., Riondato, F., Aresu, L. (2015). Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio as a useful prognostic factor in dogs with diffuse large B-cell lymphoma receiving chemoimmunotherapy. *Vet J.* 2015 Nov;206(2): 226-30. Epub 2015 Jul 14
- Martelli, M., Agostinelli, C., Di Rocco, A., Pfreundschuh, M., Pileri, S. (2013). Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 87(2):146-71. Epub 2013 Jan 30
- Meda, B., Buss, D., Woodruff, R., Cappellari, J., Rainer, R., Powell, B., Geisinger, K. (2000). Diagnosis and subclassification of primary and recurrent lymphoma. The usefulness and limitations of combined fine-needle aspiration cytomorphology and flow cytometry. *Am J Clin Pathol*, 113(5), 688-699

- Miller, A., Morley, P., Rao, S., Avery, A., Lana, S., Olver, C. (2009). Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med*, 23(1), 116-122
- Modiano, J., Breen, M., Burnett, R., Parker, H., Inusah, S., Thomas, R. (2005). Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. *Cancer res*, 65(13), 5654-5661
- Morris, J. & Dobson, J. (2001). Haematopoietic System *Small Animal Oncology* (1^a Ed., pp. 228-239): Blackwell Science
- Mutz, M., Boudreaux, B., Kearney, M., Stroda, K., Gaunt S., Shiomitsu K. (2013). Prognostic value of baseline absolute lymphocyte concentration and neutrophil/lymphocyte ratio in dogs with newly diagnosed multi-centric lymphoma. *Vet Comp Oncol*.13(4):337-47. Epub 2013 Jun 21
- Nasir, L., Devlin, P., Mckevitt, T., Rutteman, G., Argyle, D. (2001). Telomere lengths and telomerase activity in dog tissues: a potential model system to study human telomere and telomerase biology. *Neoplasia* 3(4): 351-359
- North, S., Banks, T. (2009). Tumours of the haemolymphatic system *Introduction to Small Animal Oncology* (pp. 217-230): Saunders Elsevier
- Pastor, M., Chalvet-Monfray, K., Marchal, T., Keck, G., Magnol, J.P., Fournel-Fleury, C. (2009). Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *J Vet Intern Med*, 23(2), 301-310
- Perry, J., Thamm, D., Eickhoff, J., Avery, A., Dow, S. (2010) Increased monocyte chemotactic protein-1 concentration and monocyte count independently associate with a poor prognosis in dogs with lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 9: 55–64
- Phillips B., Kass P., Naydan D. (2000). Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma, *J Vet Diagn Invest* 12:111–117
- Polton, G. (2010). Lymphoma basics in pet practice. *Irish Veterinary Journal* 61(8):539-542
- Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J. P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bonnefont, C., Fournel-Fleury, C. (2010). A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet Pathol*, 47(3), 414-433. doi: 10.1177/0300985810363902
- Porrata, L., Ristow, K., Habermann, T., Inwards, D., Micallef, I., Markovic, S. (2010). Predicting survival for diffuse large B cell lymphoma patients using baseline neutrophil/lymphocyte ratio. *Am J Hematol*. 2010 Nov;85(11):896-9
- Proctor, M., Morrison, D., Talwar, D., Balmer, S., Fletcher, C., O'Reilly, D., Foulis, A., Horgan, P., McMillan, D. (2011). A comparison of inflammation-based prognostic scores in patients with cancer. A Glasgow Inflammation Outcome Study. *Eur J Cancer* 47: 2633–2641
- Richards KL, Motsinger-Reif AA, Chen HW, Fedoriw Y, Fan C, Nielsen DM, et al. Gene profiling of canine B-cell lymphoma reveals germinal center and postgerminal center subtypes with different survival times, modeling human DLBCL. *Cancer Res* (2013) 73:5029–39. doi:10.1158/0008-5472. CAN-12-3546
- Ridge, L., Swinney, G. (2004). Angiotrophic intravascular lymphosarcoma presenting as bi-cavity effusion in a dog, *Aust Vet J* 82:616–618
- Rosenberg, M., Matus, R., Patnaik, A. (1991). Prognostic factors in dogs with lymphoma and associated hypercalcemia. *J Vet Intern Med*, 5(5), 268-271

- Rossi, G., Rossi, M., Vitali, C., Fortuna, D., Burrioni, D., Pancotto, L. (1999). A conventional beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 67(6), 3112-3120
- Rusak, M., Bołkun, L., Chociej-Stypułkowska, J., Pawlus, J., Kłoczko, J., Dąbrowska, M. (2016). Flow-cytometry- based evaluation of peripheral blood lymphocytes in prognostication of newly diagnosed DLBCL patients. 28 April 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmed.2016.04.004>
- Saba, C., Hafeman S., Vail D., *et al.* (2009). Combination chemotherapy with continuous L-asparaginase, lomustine and prednisone for relapsed canine lymphoma, *J Vet Intern Med* 23:1058–1063
- Schreiber, R., Old, L., Smyth, M. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331: 1565-1570
- Shang, B., Liu, Y., Jiang, S., Liu, Y. (2015). Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3(+) regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 5, 151–179
- Shetty, V., Mundle, S., Sanoy, A., Sanghvi, R., Loew, J., Marcus, B., Raza, A. (1995). A multivariate study of non Hodgkin's lymphoma involving proliferation, apoptosis, bcl-2 and the microenvironment. *Leuk Lymphoma*, 18(3-4), 273-279
- Kudnig, S. (2012). *Veterinary Surgical Oncology* (L. John Wiley & Sons Ed.): Blackwell Publishing
- Szkandera, J., Absenger, G., Liegl-Atzwanger, B., Pichler, M., Stotz, M., Samonigg, H., Glehr, M., Zacherl, M., Stojakovic, T., Gerger, A., Leithner, A. (2013a). Elevated preoperative neutrophil/lymphocyte ratio is associated with poor prognosis in soft-tissue sarcoma patients. *Br J Cancer* 108(8): 1677–1683
- Sokolowska, J., Micun, J., Malicka, E., Lechowski, R. (2012). Proliferation activity in canine lymphomas. *Pol J Vet Sci*, 15(4), 727-734
- Sommer, A., Bitz, A., Streckert, J., Hansen, V., Lerchl, A. (2007). Lymphoma Development in Mice Chronically Exposed to UMTS-Modulated Radiofrequency Electromagnetic Fields. *Radiat. Res.* 168, 72–80
- Stone, R., Frontera-Acevedo, K., Saba, C., Ambrose, D., Moorhead, A., Brown, C. (2011). Lymphosarcoma associated with *Heterobilharzia americana* infection in a dog. *J Vet Diagn Invest*, 23(5), 1065-1070
- Sung, S., Son, S., Park, E., Kay, C. (2017). Prognosis of locally advanced rectal cancer can be predicted more accurately using pre- and postchemoradiotherapy neutrophil-lymphocyte ratios in patients who received preoperative chemoradiotherapy. *PLoS ONE* 12(3): e0173955
- Swanson, J. (1990). Ocular manifestations of systemic disease in the dog and cat: recent development, *Vet Clin North Am (Small Anim Pract)* 20:849–867
- Swerdlow S., Harris N., Jaffe E. (2008). WHO classification of tumours of the haematopoietic and lymphoid tissues. *Lyon: IARC*.
- Swerdlow, S. (2013). Lymphoma classification and the tools of our trade: an introduction to the 2012 USCAP Long Course. *Mod Pathol*, 26 Suppl 1, S1-S14
- Szkandera, J., Pichler, M., Gerger, A., Leithner, A. (2013b). Reply: comment on 'Elevated preoperative neutrophil/lymphocyte ratio is associated with poor prognosis in soft-tissue sarcoma patients'. *Br J Cancer* 108(12): 2627
- Teske, E. (1994). Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Vet Q*, 16(4), 209-219

- Thilakaratne, D., Mayer, M., MacDonald, V., Jackson, M., Trask, B., Kidney, B. (2010). Clonality and phenotyping of canine lymphomas before chemotherapy and during remission using polymerase chain reaction (PCR) on lymph node cytologic smears and peripheral blood. *Can Vet J*, 51(1), 79-84
- Thomas, R., Smith, K., Ostrander, E., Galibert, F., Breen, M. (2003). Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probes. *Br J Cancer*, 89(8), 1530-1537
- Tizard, I.R., Richard, M.S. (2013). *Veterinary Immunology*. Elsevier: 9th edition, capítulo 13-15
- Tomiyasu, H., Takahashi, M., Fujino, Y., Ohno, K., Tsujimoto, H. (2010). Gastrointestinal and hematologic adverse events after administration of vincristine, cyclophosphamide, and doxorubicin in dogs with lymphoma that underwent a combination multidrug chemotherapy protocol. *J Vet Med Sci*, 72(11), 1391-1397
- Troppan, K., Deutsch, A., Gerger, A., Stojakovic, T., Beham-Schmid, C., Wenzl K., Neumeister, P., Pichler, M. (2014). The derived neutrophil to lymphocyte ratio is an independent prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Cancer* (2014) 110, 369–374
- Turek, M., Saba, C., Paoloni, M., Argyle, D. (2008). Canine Lymphoma and Leukemia. *Decision Making in Small Animal Oncology* (pp. 171-196): Wiley-Blackwell
- Uebelhoer, B., Barber, L., Zagarins, S., Procter-Gray, E., Gollenberg, A., Moore, A. (2012). Household chemical exposures and the risk of canine malignant lymphoma, a model for human non-Hodgkin's lymphoma. *Environ Res*, 112, 171-176
- Vail, D., Thamm, D. (2005). Hematopoietic Tumors. In: S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. (6^aEd., pp. 732-747), Missouri: Elsevier Saunders
- Vail, D., Pinkerton, M., Young, K. (2013). Canine Lymphoma and Lymphoid Leukemia, *Small Animal Clinical Oncology* (5^a Ed, pp. 608-638): Elsevier
- Valli, V., Jacobs, R., Norris, A., Couto, C., Morrison, W., McCaw, D., Moore, A. (2000). The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation. *J Vet Diagn Invest*, 12(4), 295-306
- Valli, V., Jacobs, R., Parodi, A., Vernau, W., Moore, P. (2002). Histological Classification of Hematopoietic Tumours of Domestic Animals. In *World Health Organization International Histological Classification of Tumours of Domestic Animals*
- Valli, V., Myint, S., Barthel, A., Bienzle, D., Caswell, J., Colbatzky, F., Durham, A., Ehrhart, E. J., Johnson, Y., Jones, C., Kiupel, M., Labelle, P., Lester, S., Miller, M., Moore, P., Moroff, S., Roccabianca, P., Ramos-Vara, J., Ross, A., Scase, T., Tvedten, H., Vernau, W. (2011). Classification of Canine Lymphoma according to the World Health Organization Criteria. *Vet Pathol*. 2011 Jan;48(1):198-211. Epub 2010 Sep 22
- Valli, V., Kass, P., San Myint, M., Scott, F. (2013). Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet Pathol*, 50(5), 738-748
- Vaughan, A., Johnson, J., Williams, L. (2007). Impact of chemotherapeutic dose intensity and hematologic toxicity on first remission duration in dogs with lymphoma treated with a chemor- adiotherapy protocol. *J Vet Intern Med*, 21,1332–1339

- Vezzali, E., Parodi, L., Marcato, S., Bettini, G. (2009). Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Vet Comp Oncol*, 8(1), 38-49
- Villamil, J., Henry, C., Hahn, A., Bryan, J., Tyler, J., Caldwell, C. (2009). Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *J Cancer Epidemiol*, 2009, 591753
- Voskoboinik, I., Whisstock, J., Trapani, J. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 388–400
- Waters, D. (2006). Cancer Regulation in senior animals [versão electrónica]. In: *Proceedings of the North American Veterinary Conference, Orlando, Florida*, 7 11, pp. 846- 847
- Wang, J., Gao, K., Lei, W., Dong, L., Xuan, Q., Feng, M., Wang, J., Ye, X., Jin, T., Zhang, Z., Zhang, Q. (2016). Lymphocyte-to-monocyte ratio is associated with prognosis of diffuse large B-cell lymphoma: correlation with CD163 positive M2 type tumor-associated macrophages, not PD-1 positive tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncotarget*, Vol. 8, (No. 3), pp: 5414-5425, December 27, 2016
- Waugh, E., Gallagher, A., McAulay, K., Henriques, J., Alves, M., Bell A., Morris J., Jarrett, R. (2015). Gammaherpesviruses and canine lymphoma: no evidence for direct involvement in commonly occurring lymphomas. *J Gen Virol.* 2015 Jul; 96 (Pt 7):1863-72. Epub 2015 Feb 26
- Wei, X., Wei, Y., Huang, F., Jing, H., Xie, M., Hao, X. (2014). Lymphopenia predicts preclinical relapse in the routine follow-up of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 31, 1–12
- Williams, M., Avery, A., Lana, S. (2008). Canine lymphoproliferative disease characterized by lymphocytosis: immunophenotypic markers of prognosis. *J Vet Intern Med*, 22(), 596-601
- Willmann, M., Mullauer, L., Guija de Arespacochaga, A., Reifinger, M., Mosberger, I., Thalhammer, J. (2009). Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: a novel canine pan pre-B- and B-cell marker. *Vet Immunol Immunopathol*, 128(4), 359-365
- Withrow and MacEwen. (2013). Introduction, *Small Animal Clinical Oncology* (5^a Ed, pp. xv-xvi): Elsevier
- Yazawa, M., Okuda, M., Kanaya, N., Hong, S., Takahashi, T., Ohashi, E. (2003). Molecular cloning of the canine telomerase reverse transcriptase gene and its expression in neoplastic and non-neoplastic cells. *Am J Vet Res.* 64(11): 1395-1400
- Yin, Q., Chen, L., Li, Q., Mi, R., Li, Y., Wei, X. (2014). Changes of T-lymphocyte subpopulation and differential expression pattern of the T-bet and GATA-3 genes in diffuse large B-cell lymphoma patients after chemotherapy. *Cancer Cell Int.* 14, 85
- Zamani-Ahmadmhamudi, M., Najafi, A., Nassiri, S. (2015). Reconstruction of canine diffuse large B-cell lymphoma gene regulatory network: detection of functional modules and hub genes. *J Comp Pathol* (2015) 152(2–3):119–30

16. Anexos

Anexo 1 - Comunicação em painel realizada no XII Congresso Hospital Veterinário Montenegro – Oncologia Sem Segredos



Hospital Veterinário
Berna

ESTUDO RETROSPECTIVO: AVALIAÇÃO DO TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA EM GATOS COM LINFOMA MADIÁSTÍNICO

Jesus, M.^{a,b}, Sousa I.^a, Felisberto R.^a, Henriques J.^a

^aCentro Veterinário Berna, Lisboa, Portugal
^bFaculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal

mariana.pereira.j@gmail.com



Oncologia
sem segredos



UNIVERSIDADE
DE LISBOA

Introdução

O linfoma representa quase um terço de todos os tumores em gatos e embora sua etiologia ainda não esteja completamente esclarecida, julga-se que seja multifatorial. A prevalência do linfoma mediastínico é superior em gatos jovens, machos e com infecção retroviral (FIV e FeLV). Os estudos realizados mostram ainda que o tempo de sobrevivência total (ST) médio em gatos com linfoma mediastínico é mais curto em animais FeLV antígeno (Ag) - positivo do que em animais FeLV Ag-negativo. Designa-se por ST, o espaço de tempo decorrido entre o diagnóstico e a morte do animal.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi o de avaliar o ST em gatos com linfoma mediastínico, considerando os fatores idade e infecção retroviral. Para tal, os dados foram recolhidos de forma retrospectiva de Setembro de 2011 a Novembro de 2015.

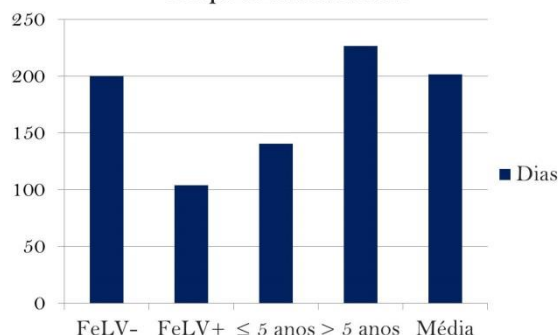
Metodologia

Foram analisados 16 gatos com idades compreendidas entre 1 e 15 anos (média 6 anos). Destes, 81% (13/16) eram machos, dos quais 100% eram castrados (13/13) e 19% (3/16) eram fêmeas, das quais 67% (2/3) eram castradas. Quanto ao estado retroviral, 44% (7/16) dos animais eram FeLV Ag-positivo e 56% (9/16) FeLV Ag-negativo. De acordo com o estadiamento clínico segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 94% (15/16) dos animais foram classificados como estadiamento IIb e 6% (1/16) como estadiamento IIIb. Quanto aos tratamentos, 75% (12/16) realizaram protocolo CHOP, 12,5% (2/16) apenas corticoterapia e 12,5% (2/16) não realizaram qualquer tratamento.

Resultados

O ST médio da amostra analisada foi de 201,54 dias. Para os animais tratados com CHOP este valor foi de 241,46 dias, para os que realizaram corticoterapia foi de 8,5 dias e para os que não realizaram tratamento foi de 16,5 dias. O ST dos gatos FeLV Ag-negativo foi de 200,22 dias e dos gatos FeLV Ag-positivo foi de 103,76 dias, não se observando associação estatística significativa entre as variáveis (p -value=0,86). O ST de gatos com idade \leq a 5 anos foi de 140,52 dias e o de gatos com idade $>$ 5 anos de 226,62 dias, não se observando associação estatística significativa entre as variáveis (p -value=0,88). A amostra foi dividida em 4 grupos, tendo em conta as variáveis infecção retroviral (FeLV Ag-positivo ou Ag-negativo) e a idade (\leq ou $>$ a 5 anos), não se observando associação estatística significativa entre as variáveis (p -value=0,95).

Tempo de Sobrevivência



Conclusão

Os resultados obtidos são concordantes com a literatura recente. Na amostra analisada, o número de machos foi superior ao número de fêmeas. Isto pode dever-se ao fato destes pacientes terem acesso à rua, e exibirem comportamentos de luta/reprodutivos, estando por isso mais susceptíveis a infecções retrovirais. Contudo, 56% dos gatos são FeLV Ag-negativo, possivelmente porque cada vez mais os animais são vacinados e têm cuidados veterinários preventivos adequados. Relativamente ao estadiamento, 94% dos gatos foram classificados como estadiamento IIb, possivelmente porque a fase da doença em que é diagnosticada revela apenas envolvimento mediastínico e os sinais clínicos estão sobretudo relacionados com o efeito de massa e efusão pleural secundária. Relativamente à terapêutica, apenas 25% dos gatos não foram submetidos a protocolo CHOP, por motivos financeiros, ou pelo fato dos pacientes não apresentarem indicação clínica. Além disso, não se obtiveram resultados estatisticamente significativos em relação à avaliação do ST considerando as variáveis: estatuto retroviral (FeLV) (p -value=0,86) e idade (p -value=0,88). O mesmo foi observado na análise realizada com os 4 grupos acima referidos (p -value=0,985). Estes resultados podem dever-se ao número reduzido e heterogeneidade da amostra, diferentes *score* clínico ao diagnóstico (escala modificada de Karnofsky) e ainda por não ter sido possível definir a entidade específica de linfoma em cada caso. Para tal, teria sido necessário realizar biópsia dos tecidos afetados, essencial para a classificação do linfoma de acordo com a OMS, o que não se realizou, principalmente por motivos financeiros dos cuidadores.

Bibliografia

1. Morris, J.; Dobson, J. (2001). *Small Animal Oncology*. (1ª ed. pp.228-238). Wiley-Blackwell
2. Clifford, C.; Mullin, C. (2015). *Feline Lymphoma*. Acedido em Nov. 15, 2015. Disponível em: http://www.cliniciansbrief.com/sites/default/files/attachments/COC_Feline%20Lymphoma.pdf